

**Einzelstrang DNA-bindende Proteine aus *Arabidopsis thaliana*:
Identifizierung, Expression und Charakterisierung**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Kathrin Hagemann

geboren am 02.02.1967 in Hannover

2004

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2000 bis Juni 2004 im Institut für Biophysikalische Chemie des Zentrums Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Claus Urbanke angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Claus Urbanke

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 02. Juli 2004

Zusammenfassung

Hagemann, Kathrin

Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus *Arabidopsis thaliana*: Identifizierung, Expression und Charakterisierung

Homotetramere Einzelstrang-DNA bindende Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation, Reparatur und Rekombination in Bakterien und eukaryotischen Mitochondrien. Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine weitergehenden Untersuchungen über tetramere SSB-Proteine in Pflanzen vor. In der vorliegenden Arbeit sollten daher pflanzliche SSB-Proteine identifiziert und charakterisiert werden.

Aufgrund von Sequenzvergleichen konnten zwei Gene in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden, deren Genprodukte Homologien zu mitochondriellen Einzelstrang-DNA bindenden Proteinen aufweisen (*AthSSB-1* und *AthSSB-2*). Die Gene von *AthSSB-1* und *AthSSB-2* wurden aus einer cDNA Bank mittels PCR amplifiziert und kloniert. Während die annotierte Sequenz von *AthSSB-2* durch DNA-Sequenzierung bestätigt wurde, ergab sich für *AthSSB-1* eine Abweichung von der Annotation. Die korrigierte DNA-Sequenz von *AthSSB-1* wurde in der EMBL-Datenbank hinterlegt (Acc.-Nr. AJ582222). Beide Proteine konnten in *E.coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert und zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden. Das zu einer Reinheit von mehr als 95 % aufgereinigte *AthSSB-1* wurde anschließend biophysikalisch charakterisiert.

Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation zeigten, dass *AthSSB-1*, im Gegensatz zu den bisher bekannten homotetrameren SSB-Proteinen in Bakterien und Mitochondrien, als partiell dissoziiertes Dimer vorliegt ($K_{\text{ass}}=3.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$). Mittels analytischer Ultrazentrifugation und Fluoreszenz-Titrations konnte gezeigt werden, dass *AthSSB-1* an poly(dT) bindet. In Fluoreszenz-Titrations wurde dabei für *AthSSB-1* in 75 mM NaCl eine Affinität von $K \cdot \omega \approx 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und eine Bedeckungslänge von 7-8 Nukleotiden pro *AthSSB-1* Monomer erhalten. Beide Parameter sind von der Salzkonzentration abhängig. Die Affinität von *AthSSB-1* zu poly(rU) ist deutlich geringer als die zu poly(dT). Stopped-Flow-Experimente von *AthSSB-1* und poly(dT) zeigten einen biphasischen Zeitverlauf der Reaktion, der als schnelle Assoziation der Dimere mit poly(dT) ($k_{\text{ass}}=1 \cdot 2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und als nachfolgende langsamere Dimerisierung der Monomere ($k_{\text{ass}}=2 \cdot 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) aufgefasst werden kann.

Zur Bestimmung der Lokalisation von *AthSSB-1* in der Pflanzenzelle wurde das über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennte Mitochondrien-Proteom aus *Arabidopsis*-Zellkulturen im Westernblot eingesetzt. Weiterhin kamen immunhistochemische Untersuchungen zur Anwendung. Die dabei erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass *AthSSB-1* im Mitochondrium lokalisiert ist.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *AthSSB-1* nicht nur über die Sequenzhomologie, sondern auch aufgrund seiner DNA-Bindungseigenschaften eindeutig den Einzelstrang-DNA bindenden Proteinen zugeordnet werden kann.

Schlagwörter: Einzelstrang-DNA bindende Proteine, Analytische Ultrazentrifugation *Arabidopsis thaliana*, Lokalisation,

Abstract

Hagemann, Kathrin

Single-stranded DNA-binding Proteins from *Arabidopsis thaliana*: Identification, Expression and Characterization.

Homotetrameric single-stranded DNA-binding proteins are involved in DNA-replication, repair and recombination in prokaryotic organisms and mitochondria of eukaryotes. Since no studies of tetrameric SSB proteins in plants were known to date, the aim of this thesis was the identification and characterization of such SSB proteins in plants.

Using homology searches two genes homologous to mitochondrial SSB proteins could be identified within the *Arabidopsis thaliana* genome data bank (*AthSSB-1* and *AthSSB-2*). Both genes were PCR amplified using cDNA as a template and cloned into expression vectors. Whereas the annotated sequence of *AthSSB-2* could be confirmed, the obtained sequence for *AthSSB-1* differed from the annotated sequence. The revised sequence was deposited in the EMBL data bank (Acc.-No. AJ582222). Both proteins could be expressed as fusion proteins in *E.coli* and could be used to raise antibodies. *AthSSB-1* was purified to more than 95% homogeneity and was used for biophysical characterization

In contrast to homotetrameric SSB proteins from bacteria and mitochondria *AthSSB-1* forms partially dissociated dimers ($K_{\text{ass}}=3.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) as could be shown by analytical ultracentrifugation. Using analytical ultracentrifugation and fluorescence titrations the binding of *AthSSB-1* to poly(dT) could be proven. At salt concentrations of 75 mM NaCl *AthSSB-1* binds to poly(dT) with an affinity of $K \cdot \omega \approx 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. The binding-site size was determined to be 7-8 nucleotides per *AthSSB-1* monomer. Both parameters were salt dependent. *AthSSB-1* also binds to poly(rU), albeit with markedly reduced affinity. The reaction kinetics of *AthSSB-1* and poly(dT) measured in stopped-flow experiments can be described by a fast association of *AthSSB-1* dimers with poly(dT) ($k_{\text{ass}}=1-2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) followed by a much slower dimerization of the protein ($k_{\text{ass}}=2-3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

To determine the localization of *AthSSB-1* within the cell a mitochondrial proteome from *Arabidopsis* cell culture was separated by 2D-gel electrophoresis and used for western blotting. In addition immunocytochemical experiments were performed. The results indicate a localization of *AthSSB-1* in mitochondria.

In this work it could be demonstrated, that *AthSSB-1* is not only related to homotetrameric SSB proteins by sequence homology but also functions as a single-stranded DNA-binding protein.

keywords: single-stranded-DNA binding protein, analytical ultracentrifugation, *Arabidopsis thaliana*, localization

Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein persönlicher Dank gilt dabei besonders

Herrn Prof. Dr. Claus Urbanke für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit unter seiner Leitung anfertigen zu können, für die Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft, für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugations-Experimente und Stopped-Flow-Kinetiken sowie für die Hilfestellung bei deren Auswertung.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Ute Curth für die theoretische und praktische Anleitung im Labor, für zahlreiche Diskussionen und Anregungen, für die Hilfe bei der Auswertung der Fluoreszenz-Titrationen und für die ständige Motivation und Geduld.

Herrn Dipl.-Biochem. Gregor Witte für die Anfertigung einiger Bilder dieser Arbeit, für die Hilfe bei EDV-Fragen, für die Durchführung analytischer Ultrazentrifugations-Experimente.

Frau Lidia Litz für die Unterstützung und zahlreichen Tipps im Labor.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Braun vom Institut für angewandte Genetik an der Universität Hannover und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Zusammenarbeit, für die Präparation des Mitochondrien-Proteoms und die Durchführung der 2D-Gel-Elektrophorese.

Frau Prof. Dr. Jutta Papenbrock vom Institut für Botanik, Universität Hannover für die freundliche Überlassung einer *Arabidopsis* cDNA Bank.

Herrn Prof. Dr. Klaus Kloppstech vom Institut für Botanik, Universität Hannover für einige fachliche Anregungen sowie den Mitarbeiterinnen des Gewächshauses für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Neumann, damaliger Mitarbeiter am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle, für die immunhistochemischen Untersuchungen der Pflanzenschnitte.

den Kollegen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hannover für die Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

den Mitarbeitern des Tierhauses der Medizinischen Hochschule Hannover, für die Zusammenarbeit bei der Gewinnung von polyklonalen Antikörpern.

den Mitgliedern meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung vor, während und (hoffentlich) nach dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	viii
Proteine	ix
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Einzelstrang-DNA bindende Proteine	1
1.2 Homotetramere Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus Bakterien und Mitochondrien.....	2
1.2.1 Biologische Bedeutung mitochondrieller SSB-Proteine.....	4
1.2.2 Struktur mitochondrieller SSB-Proteine	7
1.2.3 DNA-Bindungseigenschaften mitochondrieller SSB-Proteine.....	8
1.3 Einzelstrang DNA-bindende Proteine in Pflanzen	10
1.4 Ziel der Arbeit.....	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 Verwendete Materialien.....	12
2.2 Oligonukleotide.....	12
2.3 Peptide	12
2.4 Pflanzenmaterial.....	13
2.4.1 Ganzzell-Lysat aus Pflanzenblättern	13
2.4.2 Total-Proteinextrakt aus Pflanzen.....	13
2.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry <i>et al.</i> (1951)	13
2.5 Mikrobiologische Methoden.....	14
2.5.1 Nährmedien.....	14
2.5.2 <i>E.coli</i> -Stämme.....	15
2.5.2.1 LK111(λ).....	15
2.5.2.2 TGE900	15
2.5.2.3 BL21(DE3)pLysS.....	15
2.5.2.4 Rosetta(DE3)pLysS.....	16
2.5.2.5 SG13009	16
2.5.2.6 One Shot™ TOP10	16
2.5.3 Verwendete Vektoren	16
2.5.3.1 pCR-Zero Blunt.....	16

2.5.3.2	pSF1.....	17
2.5.3.3	pET-15b.....	17
2.5.3.4	pGEX-Vektoren.....	17
2.5.3.5	pETGEX.....	18
2.5.4	Herstellung kompetenter Zellen.....	19
2.5.5	Transformation von Plasmid-DNA.....	19
2.5.6	Glycerinkulturen.....	20
2.6	DNA Amplifikation und Präparation.....	20
2.6.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	20
2.6.2	Reinigung von PCR-Produkten.....	21
2.6.3	Plasmid-DNA-Präparation.....	21
2.6.4	Plasmid-DNA Minipräparation.....	22
2.6.5	Plasmid-DNA Minipräparation mit QIAprep.....	23
2.6.6	Plasmid-DNA Midipräparation.....	23
2.7	DNA Analyse und Modifikation.....	24
2.7.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	24
2.7.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.7.3	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	26
2.7.4	DNA-Extraktion aus Agarose.....	27
2.7.5	Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA.....	27
2.7.6	Ligation.....	28
2.7.7	DNA-Sequenzierung.....	28
2.7.7.1	Probenvorbereitung.....	29
2.7.7.2	Annealing-Reaktion.....	29
2.7.7.3	Markierungs-Reaktion.....	29
2.7.7.4	Terminations-Reaktion.....	30
2.7.7.5	Sequenziergel.....	30
2.8	Proteinexpression in <i>E.coli</i>.....	32
2.8.1	Expressionstest.....	32
2.8.2	Fermentation.....	32
2.8.3	Induktion der Proteinexpression.....	33
2.9	Aufreinigung von <i>AthSSB</i>-Proteinen.....	34
2.9.1	Zellaufschluss.....	34
2.9.2	Affinitätsreinigung über Glutathion Sepharose 4B.....	34

2.9.3	Abspaltung des GST-Fusionsanteils	35
2.9.4	Affinitätsreinigung über Blue Sepharose.....	36
2.9.5	Dialyse von Proteinen	36
2.10	Protein Charakterisierung.....	37
2.10.1	Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	37
2.10.1.1	SDS-PAGE nach Laemmli (1970)	38
2.10.1.2	SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987).....	39
2.10.2	Protein-Konzentrationsbestimmung mit UV/VIS-Spektroskopie	40
2.10.3	Quervernetzungsexperimente (Crosslink)	40
2.10.4	Analytische Ultrazentrifugation.....	41
2.10.5	Fluoreszenz-Titrationsen	44
2.10.6	Kinetische Untersuchungen	46
2.10.6.1	Stopped-Flow-Kinetik	46
2.10.6.2	Langzeitkinetik.....	47
2.11	Immunologische Methoden	48
2.11.1	Antikörper	48
2.11.2	Antiserumgewinnung.....	48
2.11.3	Proteinnachweis durch Westernblot	50
2.11.4	Proteinnachweis über 2D-Gel (IEF/SDS-PAGE) und Westernblot	52
2.11.5	Immunhistochemische Untersuchungen	53
2.12	Sequenzanalysen <i>in silico</i>	54
2.12.1	Sequenzdatenbanken.....	54
2.12.2	Algorithmen zur Vorhersage der Lokalisation	54
3	ERGEBNISSE.....	55
3.1	SSB-Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	55
3.2	Amplifikation des <i>AthSSB-1</i> Gens	57
3.3	Expression von <i>AthSSB-1</i> in <i>E.coli</i>.....	60
3.3.1	Expression als Fusionsprotein mit pGEX-Konstrukten.....	60
3.3.1.1	pGEX-2T(<i>AthSSB-1</i>) in <i>E.coli</i> LK111(λ).....	61
3.3.1.2	pGEX-2T(<i>AthSSB-1</i>) in <i>E.coli</i> SG13009.....	61
3.3.1.3	pGEX-6P(<i>AthSSB-1</i>) in <i>E.coli</i> SG 13009	63
3.3.2	Expression mit pSF und pET-Konstrukten	65
3.3.2.1	pSF(<i>AthSSB-1</i>) in TGE 900	66

3.3.2.2	pET-15b(<i>AthSSB-1</i>) in BL21(DE3)pLysS.....	66
3.4	Klonierung und Expression von <i>AthSSB-2</i>	67
3.5	Untersuchungen zur Oligomerisierung von <i>AthSSB-1</i>	69
3.5.1	Quervernetzungsexperiment (Crosslink)	69
3.5.2	Analytische Ultrazentrifugation.....	71
3.6	DNA-Bindungseigenschaften von <i>AthSSB-1</i>	74
3.6.1	Analytische Ultrazentrifugation.....	75
3.6.2	Fluoreszenz-Titrationsen	77
3.6.3	Kinetische Untersuchungen	79
3.7	Untersuchungen zur Lokalisation der <i>AthSSB</i> Proteine	82
3.7.1	<i>In silico</i> Analyse zur Lokalisation	82
3.7.2	Gewinnung von Antikörpern gegen <i>AthSSB</i>	83
3.7.3	Westernblot von Proteinextrakten aus <i>Arabidopsis</i>	84
3.7.4	Nachweis von <i>AthSSB-1</i> im Mitochondrien Proteom	85
3.7.5	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	89
4	DISKUSSION	90
4.1	Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
4.2	<i>AthSSB-1</i> bildet Dimere	92
4.3	DNA-Bindungseigenschaften von <i>AthSSB-1</i>	93
4.4	Lokalisation in der Pflanzenzelle	97
5	ANHANG	100
5.1	Sequenz von <i>AthSSB-1</i>	100
5.2	Sequenz von <i>AthSSB-2</i>	101
5.3	Oligonukleotide.....	102
5.3.1	PCR-Primer zur Amplifikation von <i>AthSSB-1</i>	102
5.3.2	PCR-Primer zur Amplifikation von <i>AthSSB-2</i>	102
6	LITERATUR	103

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	zweifach destilliertes H ₂ O
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
cDNA	DNA, die aus mRNA umgeschrieben wurde
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat
DMS	Dimethylsuberimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
KP _i	Kalium-Phosphatpuffer
LB	Luria-Bertani
MCS	<i>multiple cloning site</i>
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
ppm	<i>parts per million</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QBD	zweifach in Quarzglas destilliertes H ₂ O
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg [10 ⁻¹³ s]
S _{20,w}	Sedimentationskoeffizient in Svedberg bei 20°C in H ₂ O
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSB	Einzelstrang-DNA-bindendes-Protein
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure

TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TTP	Thymidintriphosphat
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
ε	Extinktionskoeffizient
ω	Kooperativität

Zur Abkürzung der Aminosäuren wird der Einbuchstabencode verwendet.

Proteine

Die Bezeichnung der Einzelstrang-DNA bindenden Proteine (SSBs) setzt sich aus einem kursiven Kürzel für den Organismus, dem Hinweis, dass es sich um ein mitochondrielles Protein handelt, sowie aus der Bezeichnung des Proteins zusammen. Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

<i>HsmtSSB</i>	mitochondrielles SSB aus <i>Homo sapiens</i>
<i>RnmtSSB</i>	mitochondrielles SSB aus <i>Rattus norvegicus</i>
<i>MmmtSSB</i>	mitochondrielles SSB aus <i>Mus musculus</i>
<i>XlmtSSB</i>	mitochondrielles SSB aus <i>Xenopus laevis</i>
<i>PlmtSSB</i>	mitochondrielles SSB aus <i>Paracentrotus lividus</i>
<i>DmmtSSB</i>	mitochondrielles SSB aus <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>ScmtSSB</i>	mitochondrielles SSB aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>EcoSSB</i>	SSB aus <i>Escherichia coli</i>
<i>AthSSB</i>	SSB aus <i>Arabidopsis thaliana</i>

Mutationen sind durch die Bezeichnung der Aminosäure und ihrer Position im Wildtyp mit anschließender Bezeichnung der ausgetauschten Aminosäure gekennzeichnet. So bedeutet W68A, dass das Tryptophan an Position 68 durch ein Alanin ausgetauscht ist.

Die Aminosäurenummerierung der *AthSSB*-Proteine bezieht sich auf das jeweilige Vorläuferprotein. Bei allen anderen erwähnten SSB-Proteinen basiert die Nummerierung der Aminosäuren jeweils auf der Sequenz des reifen Proteins.

1 Einleitung

1.1 Einzelstrang-DNA bindende Proteine

Innerhalb der Zelle tritt bei Prozessen, wie der Replikation, Reparatur oder Rekombination von DNA, einzelsträngige DNA (ssDNA) als Zwischenprodukt auf. Eine Gruppe von Proteinen, die an diesen Prozessen beteiligt ist, sind die Einzelstrang-DNA bindenden Proteine (SSBs, *single-stranded-DNA binding proteins*), die sequenzunspezifisch an ssDNA binden. Sie schützen die ssDNA vor dem Abbau durch Nukleasen besitzen selbst jedoch keine katalytische Aktivität. Zudem verhindern sie durch ihre Bindung die Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen wie z.B. Hairpins. Dadurch wird die Zugänglichkeit der ssDNA für die an der DNA-Replikation, Rekombination oder DNA-Reparatur beteiligten Enzyme verbessert. SSB spielt damit eine essentielle Rolle für das Überleben des Organismus (Porter *et al.*, 1990).

Einzelstrang-DNA bindende Proteine treten ubiquitär auf. Ihr Vorkommen ist in Bakterien (Sigal *et al.*, 1972; de Vries *et al.*, 1994; Purnapatre und Varshney, 1999), Archaeobakterien (Wadsworth und White, 2001) sowie bei Eukaryoten im Zellkern (Marton *et al.*, 1994; Iftode *et al.*, 1999) und in Mitochondrien (Van Dyck *et al.*, 1992; Thommes *et al.*, 1995) nachgewiesen worden. Darüber hinaus sind SSBs auch in Viren bekannt (Kneale, 1992). Aufgrund ihrer quartären Struktur kann die Vielzahl der SSB-Proteine in monomere, homodimere, heterotrimere und homotetramere Proteine unterteilt werden.

Das Gen32 Protein des T4-Phagen stellt das erste untersuchte SSB-Protein dar (Alberts und Frey, 1970) und wurde ursprünglich als helix-destabilisierendes Protein bezeichnet. Es bindet als Monomer an ca. sieben Nukleotide der ssDNA (Lohman *et al.*, 1988). Die SSB-Proteine der T7-Phagen, die Gen2.5 Proteine (Hollis *et al.*, 2001), und die Gen5 Proteine der filamentösen Phagen M13, fd, f1, I_{ke} und Pfl (Kneale, 1992) liegen als Homodimere vor. Entgegen der Funktion aller anderen SSB-Proteine, welche die DNA-Replikation fördern, haben die Gen5 Proteine der filamentösen Phagen eine replikationsterminierende Wirkung. Sie binden in der dritten Phase der Replikation an die entstehende, einzelsträngige Phagen-DNA, verhindern eine weitere Replikation und leiten dadurch die Verpackung des Phagen-genoms ein (Kneale, 1992). Die kernständigen SSB-Proteine aus Eukaryoten, die Replikationsproteine A (RP-A) oder Replikationsfaktoren A (RF-A), sind an der Replikation des Genoms beteiligt und liegen als Heterotrimere vor. Sie setzen sich aus einer ca. 70 kDa,

einer 32 kDa und einer 14 kDa großen Untereinheit zusammen. Auf der größten Untereinheit liegen drei DNA-Bindungsdomänen, eine weitere liegt auf der 32 kDa Untereinheit (Bochkareva *et al.*, 2002). Die kleine 14 kDa Untereinheit ist für die Bildung des Trimers von Bedeutung (Bochkareva *et al.*, 2002). Die umfangreichste Gruppe der SSB-Proteine bilden die homotetrameren SSB-Proteine, zu denen sowohl die eukaryotischen SSB-Proteine aus Mitochondrien als auch die bakteriellen Einzelstrang-DNA bindenden Proteine zählen. Auf die homotetrameren SSB-Proteine, insbesondere auf die mitochondrialen SSBs, wird nachfolgend näher eingegangen.

1.2 Homotetramere Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus Bakterien und Mitochondrien

Eines der am intensivsten untersuchten, homotetrameren SSBs ist das Einzelstrang-DNA bindende Protein aus *Escherichia coli* (*EcoSSB*). Es bindet mit hoher Affinität an ssDNA, deutlich schwächer an einzelsträngige RNA und es zeigt keine Affinität zu doppelsträngiger DNA. Die Bindung an ssDNA erfolgt mit moderater Kooperativität (Greipel *et al.*, 1987; Lohman und Ferrari, 1994). Einen Überblick über Funktion und Bindungseigenschaften von *EcoSSB* geben Lohman und Bujalowski (1990), Meyer und Laine (1990) und Lohman und Ferrari (1994). *In vivo* erfüllt *EcoSSB* eine wichtige Aufgabe, in dem es sequenzunspezifisch an die einzelsträngigen Bereiche bindet, die während der DNA-Replikation am Folgestrang (*lagging strand*) entstehen (vgl. Abbildung 1).

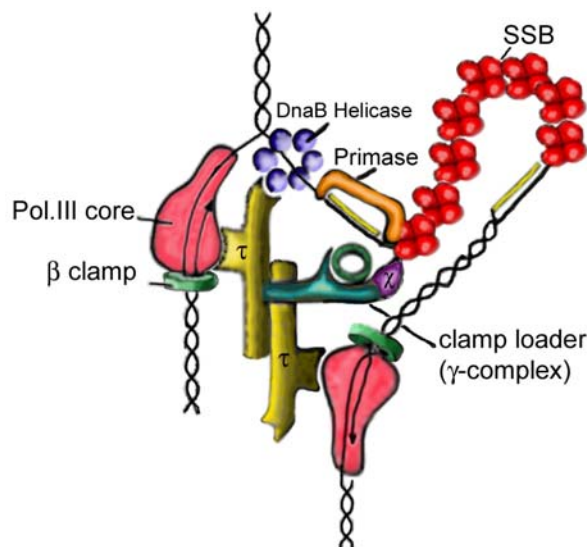


Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Replikation in *E. coli* nach Yuzhakov *et al.* (1999), modifiziert von G. Witte.

PaeSSB	----- MARGV NKV ILV GNV GGD PET RYM	23
RprSSB	----- MAGSL NKV ILI GNV GRD PEI RTT	23
EcoSSB	ma----- SRGV NKV ILV GNL GQD PEV RYM	24
HsmtSSB	MFRRPVLQVLRQ FVRHESE TTTSLv-- LERSL NRVHLLGRV GQDPVLRQV	48
RnmtSSB	MFRRPVLQVFRQ FVRQESE VASSLv-- LERSL NRVQLLGRV GQDPVMRQV	48
MmmtSSB	MFRRPVLQVFRQ FVRHESE VASSLv-- LERSL NRVQLLGRV GQDPVMRQV	48
XlmtSSB	MFHRPVLQVFRQ FARCQSTDSLAI-- LERSM NKVQLLGRV GQDPVMRQA	48
PlmtSSB	MFRRAAVQVLRQ SARFQSSDAGV---- LERSL NKVQILGRV GQDPVMRQA	46
DmmtSSB	mInp1ltg1rnl par gatttttaapakVEKTV NTVTILGRV GADPQLRGS	50
ScmtSSB	mflrtqarfhatt----- KKMDF SKMSIVGRIGSEFTEHTS	37
PaeSSB	PNGNAV TNITLATSE SWKdk----- QTGQQQERTEWHRVVFVFGRLaeia	67
RprSSB	GEGKKIINLSLATTE TWKdr----- ITSERKERTEWHRVVFIFSEglvsi	67
EcoSSB	PNGGAVANITLATSE SWRdk----- ATGEMKEQTEWHRVVFVFGKlaeva	68
HsmtSSB	EGKNPVTIFSLATNE MWRsgds evy--QLGDVSQKTTWHRISVFRPglrdv	97
RnmtSSB	EGKNPVTIFSLATNE MWRsgdn eay--QMGDVSQKTTWHRISVFRPglrdv	97
MmmtSSB	EGKNPVTIFSLATNE MWRsgds evy--QMGDVSQKTTWHRISVFRPglrdv	97
XlmtSSB	DGKNPVTIFSLATNE LWRsgen evfqPAGDVNQKTTWHRVSVFRPglrdv	98
PlmtSSB	DSKNPVTIFSVATNE MWRtges elynTSGDINQKTTWHRISVFRPglrdv	96
DmmtSSB	QEHPVVTFSVATHTN YKY----- ENGDWAQRTDWHRVVVFVKPnlrdt	92
ScmtSSB	ANNRRYLKYSIASqpr----- RDGQTNWYNITVFNepqinf	73
PaeSSB	g-EYLRKGSQVYV EGS LRTRKWQGQDGDQDRYTTEIVVd ingnmql1ggrp	116
RprSSB	veRYVTKGSKLYI EGS LQTRKWN DNSGQEKYTTEVVVlq nfns ql1ldhk	117
EcoSSB	s-EYLRKGSQVYI EGS LRTRKWT DQSGQDRYTTEVVVn vggmql1ggrq	117
HsmtSSB	ayQYVKKGSRIYL EGKI DYGEYMDKNN VRRQATTIIAd niif lsdqtkek	147
RnmtSSB	ayQYVKKGARIFV EGKV DYGEYMDKNN VRRQATTIIAd niif lsdqarek	147
MmmtSSB	ayQYVKKGARIFV EGKV DYGEYMDKNN VRRQATTIIAg kklv vhsvsgcs	147
XlmtSSB	ayQHVKKGARLLV EGKI DYGEYTDKNN VRRQATTIIAd niif lsd1rdkp	148
PlmtSSB	ayQYIRK GARVYV EGKI DYGEYTDKNN VRRQATTIIAd niif lsdtrekp	146
DmmtSSB	vLEYLKKGQRTMV QGKI TYGEI TDQGNQKTSTSIAd dvlf frdann --	140
ScmtSSB	1tEYVRK GALVYV EADAANYVF ERDDG SKGTTLSLVQk dinl kngkkle	123
PaeSSB	sgddsqr aprepm qrpqqap qqqs rpapq qqpapq aqdyd-----	157
RprSSB	nsnqtq gsg hhe ykypetk nhsfdhs-----	144
EcoSSB	gggapag gniggg qpqqgwg qpqqpqqgn qfsggaq srpqq sapaapsne	167
HsmtSSB	e-----	148
RnmtSSB	plng-----	151
MmmtSSB	legla-----	152
XlmtSSB	-----	148
PlmtSSB	-----	146
DmmtSSB	-----	140
ScmtSSB	daegqen aasse-----	135
PaeSSB	--- SFDDDI PF	165
RprSSB	--- DLDEI PF	152
EcoSSB	ppmDFDDDI PF	178
HsmtSSB	-----	148
RnmtSSB	-----	151
MmmtSSB	-----	152
XlmtSSB	-----	148
PlmtSSB	-----	146
DmmtSSB	-----	140
ScmtSSB	-----	135

Abbildung 2: Sequenzvergleich homotetramerer SSB-Proteine von PaeSSB (*Pseudomonas aeruginosa*), RprSSB (*Rickettsia prowazekii*), EcoSSB (*Escherichia coli*), und der mitochondrialen Proteine HsmtSSB (*Homo sapiens*), RnmtSSB (*Rattus norvegicus*), MmmtSSB (*Mus musculus*), XlmtSSB (*Xenopus laevis*), PlmtSSB (*Paracentrotus lividus*), DmmtSSB (*Drosophila melanogaster*) und ScmtSSB (*Saccharomyces cerevisiae*) mit dem Programm MACAW 2.0.5 (Schuler et al., 1991).

Seit den ersten Untersuchungen von *EcoSSB* (Sigal *et al.*, 1972) sind eine Reihe weiterer SSBs aus Bakterien untersucht worden, z.B. aus *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* (de Vries *et al.*, 1994), *Haemophilus influenzae* (Jarosik und Hansen, 1994), *Pseudomonas aeruginosa* (Genschel *et al.*, 1996) und *Mycobacterium tuberculosis* (Purnapatre und Varshney, 1999). Die Eigenschaften der Proteine sind denen von *EcoSSB* sehr ähnlich. Letzteres wird daher oft als Prototyp bakterieller SSBs bezeichnet. Eine Sonderstellung nehmen die bakteriellen SSB-Proteine von *Thermus thermophilus* und *Thermus aquaticus* ein, bei denen gezeigt werden konnte, dass sie als Homodimere vorliegen (Dabrowski *et al.*, 2002). Bei diesen Vertretern der *Thermus-Deinococcus*-Gruppe sind, vermutlich aufgrund einer Genduplikation, jeweils zwei DNA-Bindungsdomänen auf einem Monomer lokalisiert. Insgesamt besitzen diese SSB-Proteine dadurch genauso viele Bindungsdomänen wie ein Homotetramer.

Die mitochondriellen Einzelstrang-DNA bindenden Proteine (mtSSBs) aus Eukaryoten liegen ebenfalls als Homotetramere vor. Ein Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen mit denen der bakteriellen SSBs zeigt, dass zwischen den homotetrameren SSB-Proteinen Homologien bestehen (vgl. Abbildung 2). Innerhalb der N-terminalen zwei Drittel tragen die Proteine eine DNA-Bindungsdomäne (Williams *et al.*, 1983). Besonders konserviert ist dabei der Bereich um den Tryptophanrest 54 (bezogen auf die Sequenz von *EcoSSB*). Der stark negativ geladene Bereich am C-Terminus der bakteriellen SSBs fehlt den mitochondriellen SSBs ganz. Mitochondrielle SSB-Proteine besitzen eine N-terminale Importsequenz für den Transport ins Mitochondrium. Die Proteine spielen dort eine Rolle bei der Replikation von mitochondrieller DNA (vgl. 1.2.1).

1.2.1 Biologische Bedeutung mitochondrieller SSB-Proteine

Mitochondrien sind Zellorganellen, deren Ursprung in der Phagozytose eines α -Proteobakteriums durch einen eukaryoten Einzeller zu suchen ist (Endosymbiontentheorie). Es verwundert daher nicht, dass zwischen bakteriellen und mitochondriellen SSBs Homologien zu finden sind (vgl. Abbildung 2). Mitochondrien enthalten DNA, deren Replikation durch kernkodierte Proteine gewährleistet wird. Zu diesen Proteinen gehört neben DNA-Polymerase γ und Helicase auch das mitochondrielle SSB. Ein reifes mtSSB besitzt eine Molmasse von ca. 13-16 kDa pro Monomer (Thommes *et al.*, 1995; Loguercio Polosa *et al.*, 2002; Tiranti *et al.*, 1993; Ghirir *et al.*, 1991). Bisher sind die mtSSBs aus *Xenopus laevis* (Barat und Mignotte, 1981; Mignotte *et al.*, 1985), *Rattus norvegicus* (Hoke *et al.*, 1990), *Saccharomyces cerevisiae* (Van Dyck *et al.*, 1992), *Homo sapiens* (Curth *et al.*, 1994),

Drosophila melanogaster (Thommes *et al.*, 1995), *Mus musculus* (Li und Williams, 1997) und *Paracentrotus lividus* (Roberti *et al.*, 1997) beschrieben worden.

Die Größe des mitochondrialen Genoms variiert zum Teil beträchtlich innerhalb der Gruppe der Eukaryoten. Mitochondrielle DNA (mtDNA) in Vertebraten umfasst ca. 16–18 kb (Shadel und Clayton, 1997), in pflanzlichen Mitochondrien erreicht die mtDNA sogar Größen von bis zu 2400 kb (Ward *et al.*, 1981). Das mitochondrielle Genom von *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) umfasst 367 kb (Unselde *et al.*, 1997).

In Vertebraten ist der Ablauf der Replikation mitochondrialer DNA gut untersucht worden (vgl. Shadel und Clayton, 1997; Clayton, 2000), daher soll an ihrem Beispiel die Rolle des mitochondrialen SSB-Protein dargestellt werden. Das mitochondrielle Genom der Vertebraten besteht aus doppelsträngiger, ringförmiger DNA. Die DNA-Einzelstränge unterscheiden sich in ihrer Basenzusammensetzung und werden aufgrund ihres Verhaltens im Dichte-Gradienten als leichter (*light strand*) bzw. schwerer (*heavy strand*) Strang bezeichnet. Beide Stränge besitzen jeweils eine Promotorregion sowie einen Startpunkt für die DNA-Replikation (O_H bzw. O_L , vgl. Abbildung 3).

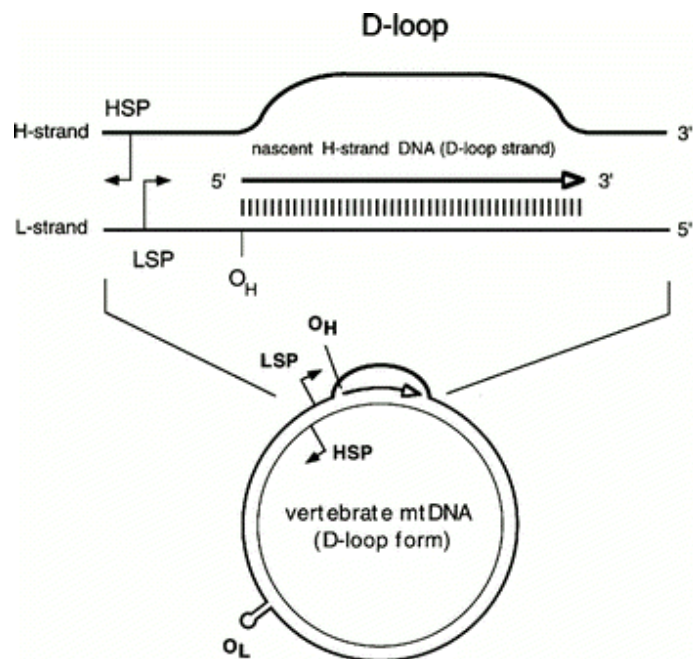


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Replikation des humanen, mitochondrialen Genoms nach Shadel und Clayton (1997).

Zu Beginn der DNA-Replikation binden Transkriptionsfaktoren an den *light strand promotor* (LSP), der in kurzer Entfernung zum O_H liegt. Die mtRNA-Polymerase synthetisiert ein kurzes RNA-Stück, wodurch ein RNA/DNA Hybrid entsteht. Durch weitere Prozessierung

resultiert der RNA-Primer, mit Hilfe dessen die DNA-Polymerase γ die Synthese des *heavy strand* beginnt. Bei dieser Synthese wird der parentale, benachbarte *heavy strand* verdrängt, wodurch der D-Loop entsteht (*displacement loop*). Nach Erreichen des Replikationsstarts des *light strand* (O_L), wird dort in entgegengesetzter Richtung die DNA-Synthese des *light strand*, ebenfalls durch Elongation eines RNA-Primers, gestartet. Der D-Loop wird während der Replikation durch mitochondrielle SSB-Proteine besetzt. Dies konnte sowohl bei mitochondrieller DNA aus Rattenleber (Van Tuyle und Pavco, 1985) als auch bei mtDNA aus *Xenopus laevis* Oocyten (Mignotte *et al.*, 1985) gezeigt werden. Das Protein stabilisiert den D-Loop und ermöglicht dadurch die ungehinderte Synthese der neuen DNA-Stränge. Aufgrund des Erscheinungsbildes, das die mtDNA während der Replikation zeigt, spricht man auch von theta-ähnlicher Replikation.

Die mtDNA verschiedener Organismen unterscheidet sich nicht nur durch ihre Größe, sie kann auch in unterschiedlichen Formen vorliegen. So gibt es verschiedene Organismen, deren mtDNA linear vorliegt (Nosek *et al.*, 1998). Ein Vertreter ist *Candida parapsilosis* (ein Hefe-Organismus), dessen mtDNA-Moleküle an den Enden einen einzelsträngigen Überhang von ca. 110 Bp besitzen (Nosek *et al.*, 1995). In jüngeren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der einzelsträngige Überhang spezifisch von einem mitochondriellen Telomer-bindenden Protein (mtTBP) erkannt wird (Nosek *et al.*, 1999). Das Protein bindet an die Telomere und schützt die Enden vor Nukleaseabbau (Tomaska *et al.*, 1997). Interessanterweise wurden in einem Sequenzvergleich Homologien zu mitochondriellen SSBs aufgezeigt. Nosek *et al.* (1999) vermuten daher, dass als Folge des Auftretens von linearer DNA, sich die Telomer-bindenden Proteine aus mitochondriellen SSBs entwickelt haben.

Eine weitere Aufgabe erfüllt das mitochondrielle SSB im Zusammenspiel mit anderen Proteinen der DNA-Replikation. So wird die Prozessivität der DNA-Polymerase γ durch die Anwesenheit des Proteins stimuliert (Mikhailov und Bogenhagen, 1996). *In vitro* Studien mit mtSSB aus *Drosophila* zeigten sowohl eine Steigerung der 5'→3' DNA Polymerase Aktivität als auch eine Steigerung der 3'→5' Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase γ (Farr *et al.*, 1999).

Die große Bedeutung der mitochondriellen SSB-Proteine ist daran erkennbar, dass ein Fehlen des *ssb*-Gens den Verlust der mitochondriellen DNA zur Folge hat (Van Dyck *et al.*, 1992).

1.2.2 Struktur mitochondrieller SSB-Proteine

Die reifen mitochondriellen SSB-Proteine liegen als Tetramere vor (Curth *et al.*, 1994; Li und Williams, 1997). Die N-terminale Importsequenz, durch den der Transport ins Mitochondrium gewährleistet wird, umfasst ca. 15-20 Aminosäuren (vgl. Tomaska *et al.*, 2001). Während des Transportes durch die Mitochondrienmembran, wird die Importsequenz abgespalten. Die Tetramerisierung der SSB-Proteine wird durch die Importsequenz nicht gestört, sie hat jedoch eine inhibitorische Wirkung bei der Bindung des Proteins an ssDNA (Li und Williams, 1997).

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mitochondrieller SSB-Proteine mit den Sequenzen bakterieller, homotetramerer SSB-Proteine (Abbildung 2) zeigt einen stark konservierten Bereich mit der nachfolgenden Konsensussequenz:

52 53 54 55 56 57 58 59 60
... T - W H R I / V - - F ...

Abbildung 4: Konsensussequenz eines stark konservierten Motives bei homotetrameren SSB-Proteinen. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz von *EcoSSB*.

Als einzige Ausnahme befindet sich bei dem SSB aus *Saccharomyces cerevisiae* (*ScmtSSB*) an Stelle von Histidin ein Tyrosin und das Arginin ist durch Asparagin ersetzt. Die starke Konservierung dieses Bereichs lässt vermuten, dass diese Aminosäuren für die SSB-Proteine eine wichtige Rolle spielen. Durch gezielte Mutationen innerhalb des Motivs wurde die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Struktur und Funktion der Proteine untersucht. In einem Experiment mit *mtSSB* aus Maus (*MmmtSSB*) wurde Histidin 69 gegen Alanin (H69A) ausgetauscht (Li und Williams, 1997). Das mutierte Protein zeigte einen im Vergleich zum Wildtyp temperatursensitiven Phänotyp, dessen Fähigkeit zur Tetramerisierung eingeschränkt ist. Eine vergleichbare Mutation ist auch für *EcoSSB* beschrieben worden. Der Austausch des Histidin 55 gegen Lysin (H55K) oder Tyrosin (H55Y) (letztere auch als *ssb-I*-Mutation bekannt (Williams *et al.*, 1984)) brachte ebenfalls temperatursensitive Proteine hervor, deren tetramere Struktur bei niedrigen Proteinkonzentrationen in ihre Untereinheiten zerfallen (Curth *et al.*, 1991). Dem Histidin kommt damit eine Bedeutung in der Ausbildung und Stabilisierung der tetrameren Struktur zu. Eine W68A Mutante von *MmmtSSB* zeigte in der Ausbildung des Tetramers hingegen keine Beeinträchtigung (Li und Williams, 1997). Das Tryptophan in der Konsensussequenz ist vielmehr an der Bindung von ssDNA beteiligt (Curth *et al.*, 1994; Li und Williams, 1997).

Die Struktur von *HsmtSSB* stellt die erste Kristallstruktur eines homotetrameren SSB-Proteins dar (Yang *et al.*, 1997). Da sich durch die Wechselwirkung zweier Monomere eine Interaktionsfläche ausbildet, die bewirkt, dass sich die gegenüberliegenden Dimere zu einem Tetramer zusammenlagern (vgl. Abbildung 5), besitzt das Tetramer D_2 -Symmetrie. Jedes Monomer enthält zwei β -Faltblatt-Strukturen, die sich zu einer fassartigen Struktur zusammenlagern sowie eine α -Helix, die die fassartige Struktur an einer Seite verschließt. Diese Anordnung weist eine deutliche Ähnlichkeit zum sogenannten OB-fold (*oligonucleotide/oligosaccharide binding-fold*) auf (Murzin, 1993). Die Struktur von *EcoSSB* ist sowohl für das Protein allein (Raghunathan *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1997) als auch im Komplex mit ssDNA beschrieben (Raghunathan *et al.*, 2000).

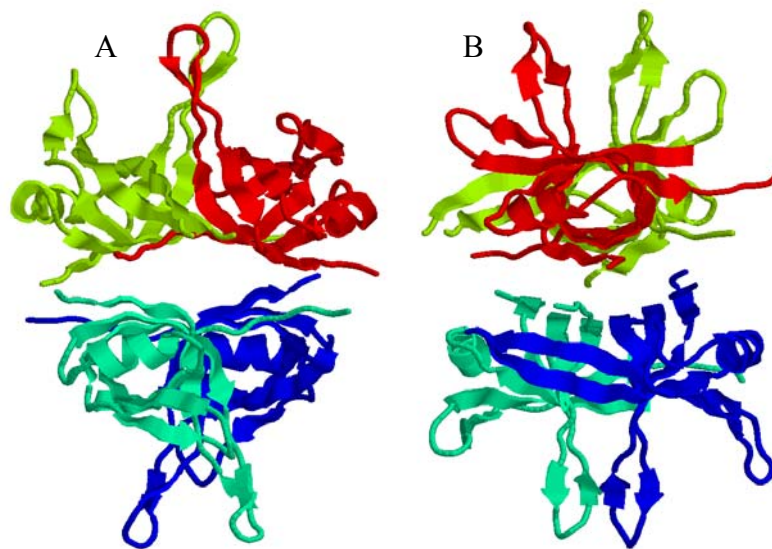


Abbildung 5: Proteinstruktur des humanen mtSSB nach Yang *et al.* (1997). B ist relativ zu A um 90° um die Längsachse nach links gedreht. Jedes Monomer ist in einer anderen Farbe dargestellt. Deutlich sind die beiden Dimere (rot/hellgrün bzw. türkis/blau) zu erkennen, die über die Interaktionsfläche das Tetramer ausbilden.

1.2.3 DNA-Bindungseigenschaften mitochondrieller SSB-Proteine

Mit Hilfe von Fluoreszenz-Titrationen können mit Nukleinsäuren die Bindungsaffinität und die Bedeckungslänge der SSB-Proteine *in vitro* bestimmt werden.

Ein *HsmtSSB* Tetramer kann bei 0.3 M NaCl 59 Nukleotide mit einer Affinität ($K_{ass} \cdot \omega$) größer $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ binden (Curth *et al.*, 1994). $K_{ass} \cdot \omega$ beschreibt dabei die kooperative Bindung des SSB-Proteins an die Nukleinsäure. Die Wechselwirkung von *HsmtSSB* und einzelsträngiger DNA ist von der Salzkonzentration abhängig. Mit steigender

Salzkonzentration erhöht sich die Bedeckungslänge von 50 Nukleotiden (50 mM NaCl) auf 70 Nukleotide pro Tetramer (2 M NaCl). Gleichzeitig wurde eine Abnahme der Bindungsaffinität beobachtet. Das Auftreten unterschiedlicher Bindungsmodi wurde bereits für *EcoSSB* beschrieben (Lohman und Bujalowski, 1990; Lohman und Ferrari, 1994). Ein *EcoSSB* Tetramer bindet bei höheren Salzkonzentrationen (>0.2 M NaCl) 65 Nukleotide eines poly(dT)-Stranges. Unterhalb 10 mM NaCl bindet das Protein jedoch nur 35 Nukleotide pro Tetramer. Das mitochondrielle SSB-Protein aus *Rattus norvegicus* bindet in 50 mM Natriumphosphatpuffer ca. 32-36 Nukleotide ssDNA pro Tetramer (Hoke *et al.*, 1990). Fluoreszenz-Titrationen des mtSSB-Proteins aus *Drosophila melanogaster* (*DmmtSSB*) ergaben bei 50 mM NaCl bereits eine Bedeckungslänge von 68 Nukleotiden (Thommes *et al.*, 1995). Bei Erhöhung der Salzkonzentration steigt die Bedeckungslänge sogar auf 112 (380 mM) bzw. 136 Nukleotide pro Tetramer (480 mM). Daher vermuten die Autoren, dass *DmmtSSB* mehrere Bindungsmodi besitzt, die von der eingesetzten Ionenstärke abhängig sind (Thommes *et al.*, 1995).

Fluoreszenz-Titrationen von *HsmtSSB* mit poly(dT) zeigen, dass bei 0.3 M NaCl die Fluoreszenz zu mehr als 90 % gelöscht wird (Curth *et al.*, 1994). Durch eine gezielte Mutation von Tryptophan 68 zu Tyrosin (W68Y), wird die Fluoreszenzlöschung verringert. Die Fluoreszenz dieser Proteinmutante beträgt nur 25 % der Wildtyp-Fluoreszenz. 75 % der Proteingesamtfluoreszenz im Wildtyp-Protein stammen damit von Tryptophan 68. Die Entfernung des aromatischen Charakters an dieser Position (W68T) verhindert die Bindung zu poly(dT) fast vollständig. Die W49Y und W49T Mutanten zeigten hingegen keine Veränderung in ihren Bindungseigenschaften zu poly(dT). Tryptophan 49 scheint daher keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität zu haben. Tryptophan 68 wird dagegen eine entscheidende Rolle bei der Bindungsaffinität zugesprochen. Vergleichbare Effekte wurden bei mtSSB-Mutanten aus Maus beobachtet (Li und Williams, 1997). Hier wurden jeweils die Tryptophanreste 49 bzw. 68 durch Alanin ausgetauscht und die Bindung an 34-mer Oligonukleotide mittels *gel mobility shift assay* untersucht. Die Bindungsaffinität von W49A bleibt weitestgehend erhalten. Nur die W68A Mutation zeigt eine schwächere Bindung an ssDNA.

Ein weiterer Effekt der DNA-Bindung von SSB-Proteinen kann in Schmelzexperimenten beobachtet werden (Curth *et al.*, 1994). Dabei wird doppelsträngige DNA (poly(dA-dT)) in An- und Abwesenheit der SSB-Proteine kontinuierlich erhitzt. Durch die Bindung des SSB-Proteins an die entstehenden einzelsträngigen Bereiche resultiert eine Schmelzpunktniedrigung der DNA. In Gegenwart von *HsmtSSB* wird in 0.1 M NaCl der

Schmelzpunkt von poly(dA-dT) um 13K erniedrigt (Curth *et al.*, 1994). Das Auftreten der Temperaturerniedrigung lässt den Schluss zu, dass das Protein an einzelsträngige DNA bindet, aber nicht an doppelsträngige DNA (dsDNA). Das Gleichgewicht zwischen ssDNA und dsDNA verschiebt sich durch die Bindung der SSB-Proteine auf die Seite der einzelsträngigen DNA, so dass die dsDNA bereits bei niedrigeren Temperaturen schmilzt.

1.3 Einzelstrang DNA-bindende Proteine in Pflanzen

Abgesehen vom Zellkern sind in einer Pflanzenzelle Mitochondrien und Plastiden als DNA-haltige Zellkompartimente enthalten. Für beide Organelltypen muss der Erhalt der DNA und deren Replikation gewährleistet werden. Dies geschieht z.B. durch die Bereitstellung der an der DNA-Replikation beteiligten Proteine. Da sowohl Mitochondrien als auch Plastiden von einem einzelligen Vorfahren (Bakterium) abstammen, ist es wahrscheinlich, dass die Mechanismen ihrer DNA-Replikation ähnlich strukturiert sind. Damit sind die pflanzlichen SSB-Proteine nicht nur, wie bereits für Tiere und Hefe gezeigt, in Mitochondrien, sondern auch in Plastiden zu erwarten.

Bislang sind aus Pflanzen nur SSB-Proteine bekannt, die an der Replikation der chromosomalen DNA beteiligt sind. So ist beispielsweise das heterotrimere RP-A aus Tabakzellen isoliert und charakterisiert worden (Garcia-Maya und Buck, 1997). Ein anderes SSB-Protein, das R-Protein, konnte aus *Lilium*-Zellen isoliert werden (Hotta und Stern, 1971). Dieses Protein besteht im Gegensatz zu allen anderen SSB-Proteinen aus Eukaryoten nur aus einer 35 kDa Untereinheit. Es ist ausschließlich im Kern von meiotischen Zellen zu finden. Die Autoren vermuten eine Beteiligung des Proteins an der DNA-Rekombination.

Einen ersten Hinweis auf SSB-Proteine in Chloroplasten geben Garcia-Maya und Buck (1997). Bei der Aufreinigung eines Zellextraktes von Tabakblättern u.a. über ssDNA-Cellulose isolierten sie fünf Proteine mit den Größen von 26, 29, 31, 33 bzw. 35 kDa. Mit Hilfe des gegen das 33 kDa Protein gerichteten Antikörpers konnten das 29 kDa und das 33 kDa Protein in Proteinextrakten von Chloroplasten nachgewiesen werden, nicht jedoch in denen von Zellkernen oder Mitochondrien. Da der Antikörper außerdem keine Kreuzreaktion mit einer der RP-A Untereinheiten zeigt, schließen die Autoren aus, dass es sich bei diesen Proteinen um Abbauprodukte von RP-A handelt. Ob diese Proteine möglicherweise ein chloroplastidäres Gegenstück zu den mitochondriellen SSBs darstellen, kann anhand der Ergebnisse jedoch nicht geklärt werden.

Ein zu den mitochondriellen Einzelstrang-DNA bindenden Proteinen und den bakteriellen SSB-Proteinen homologes SSB-Protein aus Pflanzen ist bislang noch nicht beschrieben worden.

1.4 Ziel der Arbeit

Aus der Gruppe der homotetrameren, mitochondriellen SSB-Proteine sind nach dem ersten Nachweis in *Xenopus laevis* (Barat und Mignotte, 1981) weitere mitochondrielle SSBs aus verschiedenen Organismen untersucht worden. So konnten mtSSBs aus Hefe (Van Dyck *et al.*, 1992), *Drosophila* (Thommes *et al.*, 1995) und verschiedenen Säugern identifiziert werden (Pavco und Van Tuyle, 1985; Tiranti *et al.*, 1993; Li und Williams, 1997). Der Nachweis eines SSBs in Pflanzen steht jedoch noch aus.

In der Arbeit sollen SSB-Proteine aus höheren Pflanzen am Beispiel des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* identifiziert und charakterisiert werden. Über Sequenzvergleiche sollen zuerst entsprechende Gene gefunden werden, die Homologien zu den bekannten mtSSBs aufweisen. Die anschließende Strategie beinhaltet die Klonierung und Expression der Proteine in *E.coli*. Nachfolgend soll eine geeignete Aufreinigungsmethode entwickelt werden.

Zur Charakterisierung der rekombinanten Proteine sind Untersuchungen der Bindungseigenschaften an Nukleinsäuren sowie zum Oligomerisierungszustand vorgesehen. Für diese Experimente sollen Methoden wie analytische Ultrazentrifugation, Quervernetzungsexperimente, Stopped-flow-Kinetiken und Fluoreszenz-Titrationen zur Anwendung kommen. Darüber hinaus sind die Gewinnung von Antikörpern und Untersuchungen zur Lokalisation der Proteine vorgesehen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad *pro analysi* verwendet und von den Firmen Merck, Sigma, Serva, Roth und Fluka bezogen. Zur Anzucht von Bakterien wurden die Nährmedien der Firma Gibco verwendet.

Bei den Titrationsen kamen poly(dT) (Länge der Polymere ca. 900 Nukleotide) und poly(rU) zur Anwendung (Pharmacia). Zur Auswertung wurden Extinktionskoeffizienten von $8600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (poly dT) und $9200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (poly rU) eingesetzt.

2.2 Oligonukleotide

Die zur Sequenzierung und Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert. Die einzelnen Sequenzen sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang dargestellt.

2.3 Peptide

Die synthetischen Peptide, die als Antigen zur Antikörper Herstellung eingesetzt wurden, sind Produkte der Fa. Affina Immuntechnik, Berlin. Peptid AthP-1.1 wurde aufgrund der geringen Sequenzhomologie im Vergleich zu *HsmtSSB* ausgewählt, wodurch Kreuzreaktionen zu anderen SSBs vermieden werden sollten. Die Sequenz von Peptid AthP-1.2 umfasst einen Bereich, der in *HsmtSSB* einem Loop entspricht, und somit exponiert vorliegt.

- Peptid AthP-1.1: VEEDFEENVTERPEC-KLH
- Peptid AthP-1.2: DQRLVGATNQPKPAC-KLH

Die Reinheit der gelieferten Peptide betrug $>60 \%$ (Peptid AthP-1.1) bzw. $>80 \%$ (Peptid AthP-1.2). Beide Peptide sind N-terminal acetyliert. Über ein zusätzliches Cystein am C-Terminus wurden die Peptide an das Trägerprotein KLH (*keyhole limpet hemocyanine*) gekoppelt (Fa. Affina Immuntechnik, Berlin).

2.4 Pflanzenmaterial

Die Aussaat und Anzucht der Pflanzen erfolgte durch die Mitarbeiter des Instituts für Botanik, Universität Hannover in deren Gewächshaus. Für die Versuche wurde *Arabidopsis thaliana columbia* (WT) verwendet, die unter normalen Tag-Nacht-Bedingungen im Gewächshaus angezogen wurden.

2.4.1 Ganzzell-Lysat aus Pflanzenblättern

Ca. 0.3 - 0.5 g Blätter von *Arabidopsis* werden geerntet und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. In einem mit Stickstoff vorgekühltem Mörser werden die Blätter sorgfältig zermahlen und anschließend in 0.5 ml Auftragspuffer (vgl. 2.10.1.1) aufgenommen. Anschließend werden die Proben für 5 min bei 15.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und für 5 min bei 95°C gekocht und auf Eis abgeschreckt. Das Ganzzell-Lysat kann dann zur SDS-PAGE (2.10.1) und anschließendem Westernblot (2.11.3) eingesetzt werden.

2.4.2 Total-Proteinextrakt aus Pflanzen

Extraktionspuffer:

- 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8
- 2 % SDS
- 100 mM DTT
- 1 mM EDTA
- 10 % (v/v) Glycerin

Ca. 0.1 - 1 g Blattmaterial werden geerntet und rasch in flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser zerrieben. Das Pulver wird in 10 ml 4°C kalten Extraktionspuffer pro Gramm Gewebe überführt, die Suspension bei 65°C für 20 min inkubiert und das ungelöste Material bei 16.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird in Aliquots bei -20°C gelagert. Für eine Analyse über Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot werden äquivalente Volumen einer Extraktion aufgetragen oder nach Proteinbestimmung (vgl. 2.4.3) gleiche Proteinmengen eingesetzt.

2.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* (1951)

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in Proteinextrakten wird eine modifizierte Methode nach Lowry *et al.* (1951) verwendet.

Verwendete Lösungen:

Lösung I:	5 g Na ₂ CO ₃ und 50 mg Dinatriumtartrat in 250 ml 0.1 N NaOH lösen
Lösung II:	0.5 g CuSO ₄ ·5 H ₂ O in 100 ml H ₂ O lösen
Lösung III:	1 Volumen Lösung II mit 49 Volumen Lösung I kurz vor Gebrauch mischen
Lösung IV:	1 Volumen Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck) mit 1 Volumen H ₂ O mischen

Es wird eine Lösung von 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in 150 mM NaCl hergestellt, die als Stammlösung für eine Eichreihe eingesetzt wird. Die genaue Konzentration der Stammlösung wird durch Messung der Extinktion bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon=0.66$ ml/mg·cm bestimmt. Verschiedene Aliquots der BSA-Stammlösung von 0-100 μ l (entspricht dann 0-100 μ g Protein) sowie 20 μ l des Proteinextraktes werden mit bidest H₂O auf 100 μ l aufgefüllt und mit 0.5 ml eiskalter, 10 % (w/v) TCA versetzt. Die Fällung wird über 30 min auf Eis vervollständigt, 15 min mit 15000 x g zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgesaugt. Das Sediment wird unter Zugabe von 200 μ l 0.1 N NaOH und 1 ml Lösung III gelöst und für 10 min bei RT inkubiert. 100 μ l Lösung IV werden unter sofortigem Mischen zugegeben und für weitere 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Extinktion der Ansätze bei 750 nm gegen den Referenzwert ohne BSA (0 μ g) gemessen und aus den Daten eine Eichgerade erstellt.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Nährmedien

Folgende Medien wurden für die Anzucht von *E.coli*-Stämmen verwendet:

LB:	5 g NaCl 10 g Peptone 140 10 g Hefeextrakt mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, mit NaOH auf pH 7.5 einstellen → autoklavieren
-----	--

SOC:	2 % (w/v) Tryptone
	0.5 % (w/v) Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2.5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose
	→ autoklavieren

Zur Herstellung von LB-Platten wird das Medium vor dem Autoklavieren mit 15 g/l Bactoagar versetzt. Danach lässt man das Medium unter Rühren auf ca. 50°C abkühlen, versetzt gegebenenfalls mit Antibiotika und gießt anschließend die Platten. Als Endkonzentration wurde für Ampicillin 100 µg/ml, für Chloramphenicol 30 µg/ml, für Tetracyclin 10 µg/ml und für Kanamycin 50-100 µg/ml eingesetzt.

2.5.2 *E.coli*-Stämme

2.5.2.1 LK111(λ)

LK111(λ) (*thi-1*, *leuB6*, *tonA21*, *thr-1*, *supE44*, *lacI^q*, *lacZΔM15*, (Zabeau und Stanley, 1982)) wurde zur Vermehrung von Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen sind λ-lysogen, der λ-cI-Repressor wird daher konstitutiv exprimiert. Dadurch können Plasmide mit λ-P_L-Promotors vermehrt werden, ohne dass es zu einer nennenswerten Expression der jeweiligen Genprodukte unter λ-P_L-Promotor-Kontrolle kommt. Die Anzucht erfolgt bei 37°C in LB Medium.

2.5.2.2 TGE900

TGE900 (F⁻, *su⁻*, *ilv⁻*, *bio*, (λ*cI857ΔBamΔHI*); (Courtney *et al.*, 1984)) codiert für den temperatursensitiven λ*cI857*-Repressor, der bei 30°C stabil ist, bei 42°C jedoch inaktiv ist. Der Stamm wird zu Überexpression von Plasmiden verwendet, deren Gene unter der Kontrolle des P_L-Promotor des Phagen λ stehen. Die Anzucht erfolgt bei 30°C in LB Medium.

2.5.2.3 BL21(DE3)pLysS

BL21(DE3)pLysS (F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysS (Studier und Moffatt, 1986)) ist ein λ-lysogener Stamm, der eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase Gens

trägt (DE3). Die Regulation erfolgt über den IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotor. Um die Grundexpression der T7-RNA-Polymerase möglichst gering zu halten, wird über pLysS T7-Lysozym exprimiert, der natürliche Inhibitor der T7-RNA-Polymerase. Der Stamm wurde zur Expression von pET-Konstrukten verwendet, deren Insert unter T7*lac*-Promotor stehen. pLysS codiert außerdem für eine Chloramphenicolresistenz. Die Anzucht der Zellen erfolgt bei 37°C in LB-Medium.

2.5.2.4 Rosetta(DE3)pLysS

Rosetta(DE3)pLysS (F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysS/RARE (*argU, argW, ilex, glyT, leuW, proL*); (Novagen)) ist ein BL21 Derivat. Der Stamm codiert ebenfalls chromosomal für die T7-RNA-Polymerase (DE3) und für T7-Lysozym (über pLysS). Zusätzlich wird der Stamm durch tRNA-Gene unterstützt, die in *E.coli* selten vorkommen. Die Expression eukaryotischer Proteine wird in diesem Stamm unter Umständen begünstigt.

2.5.2.5 SG13009

Der SG13009 Stamm (F⁻, *his, pyrD, Δlon⁻¹⁰⁰, rpsL* (Gottesman *et al.*, 1981)) trägt das pUHA1-Plasmid, über das eine Kanamycinresistenz eingebracht wird. SG13009 ist defizient für das *lon* Gen, dessen Produkt, die La-Protease, für den Abbau von falsch gefalteten oder anormalen Proteinen in *E.coli* verantwortlich ist (Goldberg, 1992). Dadurch wird die Expression von eukaryotischen Genen in diesem Stamm möglicherweise begünstigt. SG13009 Zellen wurden für die Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet. Die Anzucht erfolgte bei 30°C oder 37°C in LB Medium.

2.5.2.6 One Shot™ TOP10

E.coli TOP10 (F⁻, *mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG* (Invitrogen)) wurde zur Vermehrung von pCR-Blunt Plasmiden (Invitrogen) verwendet. Der Stamm ist defizient für den *lac*-Repressor (*lacI^q* negativ). Das Einbringen eines Gens unter Kontrolle des *lac*-Promotors hat eine konstitutive Expression der Gen-Produkte zur Folge. Die Anzucht erfolgte bei 37°C in SOC Medium.

2.5.3 Verwendete Vektoren

2.5.3.1 pCR-Zero Blunt

pCR-Blunt (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen) ist ein 3.5 kBp großer Vektor, der zur Vervielfältigung von blunt end PCR Produkten eingesetzt wurde. Das Plasmid trägt das *ccdB*

Gen (C-terminal zum *lacZ α* -Gen), dessen Produkt für *E.coli* Zellen toxisch ist (Bernard *et al.*, 1994). Das *ccdB*-Gen steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Bei Transformation in einen *lacI^q* negativen Stamm (wie One ShotTM TOP10 Zellen) wird dadurch eine konstitutive Expression erwirkt. Die Ligation eines PCR-Produktes über die MCS unterbricht das Gen und verhindert nach der Transformation die Expression des toxischen Genproduktes. Als Selektionsmarker trägt der Vektor eine Kanamycinresistenz.

2.5.3.2 pSF1

Das Plasmid pSF1 (Bayer *et al.*, 1989) enthält das *EcoSSB*-Gen unter der Kontrolle des λ -P_L-Promotors. Vor der Klonierung muss das *EcoSSB*-Gen daher mit *EcoRI* heraus geschnitten werden. Nach Einbringen des *AthSSB-1*-Gens (ebenfalls über *EcoRI*) unterliegt dieses der Kontrolle des λ -P_L-Promotors. In λ -lysogenen Stämmen wird die Expression des Proteins durch den λ -Repressor ständig reprimiert.

2.5.3.3 pET-15b

pET-15b (Novagen) ist ein Expressionsvektor mit *T7lac* Promotor, der durch den *lac*-Repressor reprimiert werden kann. Die Expression von Genen unter Kontrolle des *T7lac*-Promotors können nur in Stämmen erfolgen, die das Gen1 des Bacteriophagen T7 enthalten, welches für die T7-RNA-Polymerase codiert. Die Klonierung des Inserts erfolgt über *NcoI* und *XhoI*. Zur Selektion auf positive Transformanden trägt der Vektor eine Ampicillinresistenz.

2.5.3.4 pGEX-Vektoren

pGEX-Vektoren (Amersham) werden zur Herstellung von Fusionsproteinen mit Glutathion-S-transferase (GST) eingesetzt. Sie tragen das *gst*-Gen unter Kontrolle des *tac*-Promotors (synthetisch aus *trp* und *lac* Promotor), das Insert wird über die MCS C-terminal an das *gst*-Gen angefügt. Die Klonierung des Inserts erfolgt über *BamHI* und *XhoI*. Als Selektionsmarker tragen die Vektoren eine Ampicillinresistenz. Zur Herstellung von Fusionsproteinen wurden pGEX-2T und pGEX-6P verwendet (vgl. Abbildung 6). Um den GST-Fusionsanteil nach der Expression wieder abtrennen zu können, besitzt pGEX-2T am Ende des *gst*-Gens eine Thrombinschnittstelle. Bei pGEX-6P ist diese Schnittstelle durch die der PreScission Protease ersetzt. Letztere spaltet zwischen Glutamat und Glycin. Der hier eingesetzte pGEX-6P Vektor besitzt eine zum Originalvektor leicht modifizierte *multiple cloning site*.

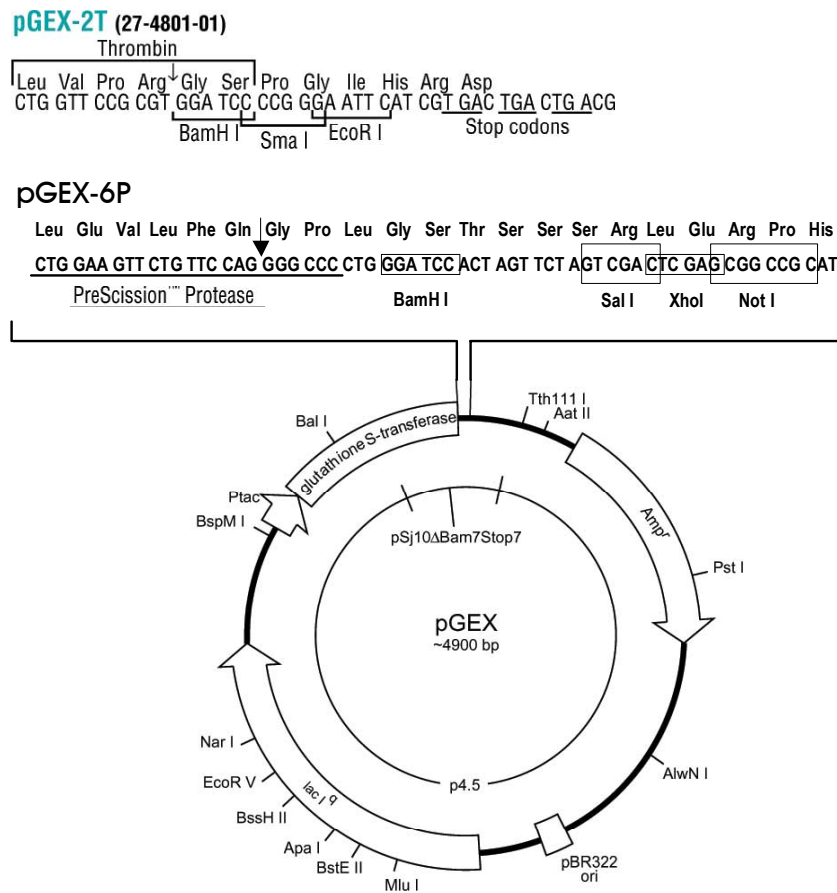


Abbildung 6: Darstellung der eingesetzten pGEX-Vektoren (Gene Fusion System, 3rd Edition, Amersham Pharmacia Biotech). Es wurden der Original pGEX-2T sowie ein in der multiple cloning site modifizierter pGEX-6P Vektor verwendet.

2.5.3.5 pETGEX

Der pETGEX-Vektor ist ein Konstrukt, bei dem das Glutathion-S-transferase Gen unter Kontrolle des T7 Promotors steht. Aus pET-15b (Novagen), wurde durch eine Spaltung mit *Bam*HI und anschließendem Auffüllen der Enden die *Bam*HI Schnittstelle entfernt, so dass das Plasmid pET-15bΔ*Bam*HI resultiert. Aus dem Vektor pGEX-6P (Amersham) wurde mittels PCR das *gst*-Gen inklusive der sich anschließenden MCS amplifiziert. Durch den Einsatz entsprechender Primer wurde das Insert gleichzeitig mit *Bsa*I und *Xho*I Schnittstellen ausgestattet. Der Rahmen pET-15bΔ*Bam*HI wurde mit *Nco*I und *Xho*I geschnitten, während das Insert mittels *Bsa*I/*Xho*I Spaltung für die Ligation vorbereitet wurde. Nach der Ligation bleiben die *Xho*I und *Nco*I Schnittstellen erhalten, die *Bsa*I Schnittstelle ist entfernt. *Ath*SSB-2 wurde über *Nco*I/*Xho*I in den Vektor kloniert, bei der Expression resultiert dann ein Fusionsprotein von 47 kDa. Der Fusionsanteil der Glutathion-S-Transferase lässt sich wie bei pGEX-6P mit PreScission Protease abspalten (vgl. Abbildung 6).

2.5.4 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wird die TSS-Methode (*transformation und storage in the same solution*) nach Chung *et al.* (1989) verwandt.

Verwendete Lösungen:

TSS-Lösung:	LB Medium mit
	10 % (w/v) PEG 6000
	5 % (v/v) DMSO
	50 mM MgSO ₄
	→ pH-Wert 6.5-6.8
	→ autoklavieren

Damit Bakterienzellen Plasmide besser aufnehmen können, werden sie vorher nach der TSS-Methode behandelt. Hierzu wird eine 20 ml Vorkultur der entsprechenden Zellen in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. 2.5 ml der Über-Nacht-Kultur werden in 250 ml LB überführt und bis zu einer $E_{1cm}^{600nm} = 0.3-0.5$ angezogen. Dann überführt man 100 ml der Zellen in sterile Zentrifugenbecher und zentrifugiert 10 min im vorgekühlten Rotor bei 650 x g. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 10 ml eiskalter TSS-Lösung aufgenommen. Die Zellen werden in 100-200 µl Aliquots in Eppendorfreagiergefäße portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen werden bei -70°C gelagert.

Zur Überprüfung der Kompetenz 1 µg Plasmid-DNA (z.B. pUC8) transformiert, die Zellen auf Selektivmedium ausgestrichen und nach Inkubation die Klone ausgezählt. Zellen, die nach der TSS-Methode behandelt werden, erreichen Kompetenzen von ca. 10⁶ Klonen pro µg transformierter Plasmid-DNA.

2.5.5 Transformation von Plasmid-DNA

Zur Transformation werden 0.5-2 µg Plasmid-DNA zu 100-200 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach führt man einen Hitzeschock bei 42°C für 45 sec durch und schreckt auf Eis ab. Anschließend werden die Zellen auf LB-Platten (+ entsprechendes Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Verwendung des TGE900 Stamms, dessen temperatursensitiver Repressor bei Temperaturen über 40°C inaktiv wird, wird der Hitzeschock bei 37°C und die anschließende Inkubation bei 30°C durchgeführt.

2.5.6 Glycerinkulturen

Für eine langfristige Aufbewahrung der *E.coli*-Stämme werden Aliquots einer Zellsuspension als Glycerinkultur angelegt. Hierzu impft man 20 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer Selektivplatte an und lässt über Nacht bei entsprechender Temperatur schütteln. In ein steriles Röhrchen mit 150 µl Glycerin (87 % (v/v)) werden 750 µl der Kultur überführt. Die Glycerinkulturen sind bei -70°C mehrere Jahre haltbar.

2.6 DNA Amplifikation und Präparation

2.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode beruht auf der Amplifikation doppelsträngiger DNA mit Hilfe synthetischer Primer und einer thermostabilen DNA-Polymerase.

Zuerst werden die DNA Doppelstränge erhitzt und damit in ihre Einzelstränge denaturiert, anschließend wird der Ansatz auf die sogenannte *Annealing*temperatur abgekühlt, so dass die DNA-Primer an den für sie komplementären Bereichen hybridisieren können. Für die Amplifikation eines Gens verwendet man idealerweise einen Primer, der der Anfangssequenz des Gens entspricht, sowie einen Primer, der komplementär zum Ende der zu amplifizierenden Sequenz ist. Die Länge der DNA-Primer umfasst ca. 20-25 Basenpaare. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase werden die hybridisierten Primer am DNA-Template verlängert (Elongation), so dass nach dem ersten Zyklus zwei Doppelstränge des gewünschten Bereiches vorliegen. Durch weitere Zyklen von Denaturierung, *Annealing* und Elongation wird der gesuchte DNA Abschnitt exponentiell vervielfältigt.

10x cloned Pfu Buffer (Stratagene)	200 mM Tris/HCl pH 8,8
	20 mM MgSO ₄
	100 mM KCl
	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	1 % Triton X-100
	1 mg/ml BSA (Nukleasefrei)
dNTP Mix:	2mM dTTP (2' deoxynucleoside 5' triphosphate)
(Pharmacia Biotech)	2mM dATP
	2mM dCTP
	2mM dGTP

Für einen PCR Ansatz werden 0.5–1 µl einer cDNA Bank von *Arabidopsis thaliana* (freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Papenbrock, Universität Hannover, Institut für Botanik) zur Verfügung gestellt) mit je 200 µM dNTPs, je 500 nM Hin- und Rückprimer und 2.5 µl 10x Pfu Puffer gemischt und mit QBD auf 25 µl aufgefüllt. Der Probenansatz wird für 3 min auf 80°C erhitzt und dann mit 0.5–1 µl cloned Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, 2.5 units/µl) versetzt (*Hotstart*). Man lässt die DNA zuerst bei 94°C für 5 min denaturieren, dann folgen mehrere Zyklen von jeweils 45 sec bei 94°C (Denaturierung), 20 sec bei gewünschter *Annealing*temperatur (hier zwischen 46–60°C) und 90 sec bei 72°C (Elongation). Abschließend wird die Temperatur für 10 min bei 72°C gehalten. So können Stränge von unvollständiger Länge durch die DNA-Polymerase noch „aufgefüllt“ werden. Bis zur Entnahme aus dem Gerät werden die Proben auf 4°C heruntergekühlt. Die Reaktionen wurden im Thermo Hybaid-PX2 oder MJ Research PTC-2000 Gradient Cycler durchgeführt.

2.6.2 Reinigung von PCR-Produkten

Um die erhaltenen PCR Produkte von Primern, Nukleotiden und Polymerase zu befreien, wird nach der Amplifikation eine Reinigung der DNA Fragmente vorgenommen. Die Aufreinigung erfolgte nach dem QIAquick PCR Purification Kit Protocol (Fa. QIAGEN, Hilden) unter Verwendung der dort mitgelieferten Puffer.

Zum PCR Ansatz wird das 5fache Volumen Puffer PB gegeben und gründlich vermischt. Man gibt die DNA auf ein vorbereitetes QIAquick Säulchen und zentrifugiert 1 min bei 13.000 x g. Es wird mit 0.75 ml Puffer PE gewaschen und zentrifugiert, und durch erneutes Zentrifugieren restlicher PE Puffer entfernt. Der Durchfluss wird verworfen und die DNA mit 50 µl Puffer EB eluiert. Die Proben werden bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

2.6.3 Plasmid-DNA-Präparation

Die Plasmid-Präparation wird nach einem modifizierten Verfahren von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die Bakterienzellen werden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die chromosomale DNA ausgefällt. Die im Überstand verbliebene Plasmid-DNA wird durch Isopropanol ausgefällt. Durch Zugabe von NH₄Ac wird ein „Aussalzen“ der Proteine erwirkt. Durch weiteres Fällern mit Ethanol und anschließendem Waschen wird die Plasmid-DNA gereinigt.

Lösung I:	25 mM Tris/HCl, pH 8.0 10 mM Na ₂ EDTA 50 mM Glucose → autoklavieren
Lösung II:	0.2 M NaOH 1 % (w/v) SDS (frisch aus Stammlösungen ansetzen)
Lösung III:	3 M KAc/HAc, pH 4.8
TE:	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA → autoklavieren

2.6.4 Plasmid-DNA Minipräparation

Mit einer Einzelkolonie von einer Platte werden 4 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei angemessener Temperatur (30°C oder 37°C) inkubiert.

Zweimal 1.5 ml dieser Über-Nacht-Kultur werden in Eppendorf-Reagiergefäßen bei 8000 x g je 30 sec abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Mit 200 µl Lösung I erfolgt eine gründliche Resuspension des Pellets. Nach Zugabe von 400 µl frischer Lösung II inkubiert man 5 min auf Eis. Unter Zugabe von 300 µl Lösung III lässt man die Suspension weitere 5-10 min auf Eis stehen. Anschließend wird 15 min bei 8000 x g zentrifugiert der Überstand in 400 µl Isopropanol gegeben und für 5 min inkubiert. Nach weiteren 10 min Zentrifugation bei 8000 x g wird der Überstand gut abgesaugt und das Pellet im Vakuum getrocknet. Das Pellet wird in 150 µl TE resuspendiert, mit 50 µl 10M NH₄Ac versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 8000 x g abzentrifugiert. 400 µl eiskalter Ethanol wird vorgelegt, mit dem Überstand der Zentrifugation versetzt, gut gemischt und für 15 min bei -70°C inkubiert. Nach 10 min weiterer Zentrifugation (8000 x g) wird das Sediment mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und wie zuvor 5 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird im Vakuum getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen. Die Konzentration der DNA Lösung wird über eine Agarose Gelelektrophorese (2.7.2) abgeschätzt.

2.6.5 Plasmid-DNA Minipräparation mit QIAprep

Die Durchführung richtet sich nach dem Herstellerprotokoll der Fa. QIAGEN, die Zusammensetzung der Puffer werden dort nicht angegeben.

Man impft mit einem Klon eine 4 ml LB Kultur an (+ Antibiotikum) und lässt über Nacht bei optimaler Temperatur wachsen. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl Puffer P1 (versetzt mit 100 mg/ml RNase A) gründlich resuspendiert. Zur Lyse wird mit 250 µl Puffer P2 versetzt, vorsichtig geschwenkt und anschließend mit 350 µl Puffer N3 neutralisiert. Man zentrifugiert 10 min bei 13.000 x g überführt den Überstand auf QIAprep Säulchen und zentrifugiert für weitere 60 sec. Der Durchlauf wird verworfen. Die Plasmid-DNA wird jeweils mit 0.5 ml Puffer PB und 0.75 ml Puffer PE gewaschen (jeweils 60 sec, 13.000 x g, Durchlauf verwerfen) und für eine weitere Minute zentrifugiert. Man platziert die QIAprep Säule auf ein sauberes Reaktionsgefäß und eluiert die Plasmid-DNA mit 50 µl Puffer EB (10 mM Tris/HCl, pH 8.5) durch anschließende Zentrifugation (1 min).

2.6.6 Plasmid-DNA Midipräparation

100 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) werden mit einer Einzelkolonie von einer Platte angeimpft und über Nacht bei entsprechender Temperatur im Schüttelwasserbad inkubiert.

Man zentrifugiert die Zellen 5 min bei 6000 x g, verwirft den Überstand, resuspendiert gründlich das Sediment in 2 ml Lösung I, versetzt zur weiteren Lyse der Bakterien-Zellwände mit 2 ml Lösung I (+ 8 mg/ml Lysozym) und inkubiert für 15 min bei Raumtemperatur. Man gibt 8 ml frische Lösung II dazu, mischt vorsichtig und inkubiert für 10 min auf Eis, bis eine klare, viskose Lösung entsteht. Diese wird mit 6 ml Lösung III versetzt, ebenfalls vorsichtig gemischt, bis die chromosomale DNA als weißer Flocken ausfällt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 6000 x g wird der Überstand durch einen Faltenfilter in 11 ml Isopropanol gegeben und die Fällung bei -70°C vervollständigt. Wiederum wird mit 6000 x g 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Vakuum getrocknet. Das Sediment wird sorgfältig mit 1.6 ml 1x TE resuspendiert, mit 0.4 ml ca. 10 M NH_4Ac versetzt, weitere 20 min auf Eis inkubiert und 15 min wie zuvor abzentrifugiert. Um die Plasmid-DNA auszufällen, wird der Überstand in 4 ml 96 % Ethanol überführt, 10 min bei -70°C inkubiert, 15 min (6000 x g) zentrifugiert und erneut im Vakuum getrocknet. Das Pellet wird nochmals in 800 µl 1x TE gelöst mit 16 µl 5 M NaCl und 1.6 ml 96% Ethanol versetzt, 10 min bei -70°C gefällt, sowie 15 min wie zuvor zentrifugiert. Abschließend wäscht man das Pellet mit 70 % Ethanol, zentrifugiert und trocknet es. Nach Aufnahme in 100 µl 1x TE wird die Konzentration der Plasmid-DNA über eine Agarose

Gelelektrophorese abgeschätzt. Sie liegt in der Regel bei ca. 1 µg/µl. Die Proben werden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.7 DNA Analyse und Modifikation

2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse, ob durch die PCR DNA-Stücke in der erwarteten Größe amplifiziert werden, werden die Proben auf ein 5 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt.

verwendete Lösungen:

10x TPE-Puffer:	20 mM Na ₂ EDTA 0.89 M Tris 2.15 % (v/v) 85 % H ₃ PO ₄ → pH 8.0 mit H ₃ PO ₄ einstellen
Acrylamid-Fertiglösung:	30 % Acrylamid 0.8 % Bisacrylamid
Auftrags-Puffer:	0.1 % Azorubin in H ₂ O

Das Gel hat die Dimensionen 9 cm x 6 cm und eine Dicke von ca. 1 mm. Zwei Glasplatten werden an drei Seiten durch Spacer getrennt und zusammen geklammert. 0.7 ml 10x TPE werden mit 1.16 ml Acrylamidlösung versetzt und mit QBD auf 7 ml aufgefüllt. Der Lösung werden je 16 µl TEMED und (NH₄)₂SO₄ zugegeben, das Gel sofort gegossen. Anschließend wird der Kamm am oberen Gelende platziert und fixiert. Nach der vollständigen Polymerisierung des Gels wird dieses in eine Gelkammer eingespannt und in die Kammern 1x TPE als Laufpuffer gefüllt. Der Kamm wird entfernt und die Probetaschen mit Laufpuffer gespült. 5 µl einer Probe (hier PCR Produkte) werden mit 5 µl Azorubin (+Glycerin) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Proben werden bei einer Spannung von 100 V für ca. 45 min aufgetrennt. Zur Analyse wird das Gel in einer Ethidium-Bromid-Lösung für 10 min im Dunkel inkubiert und anschließend mit Wasser gespült. Die Fluoreszenz des Ethidium-Bromids kann auf dem Leuchttisch bei 312 nm Anregungswellenlänge detektiert werden. Zur Dokumentation wird das Gel fotografiert.

Längenstandard:

Um die Größe der erhaltenen DNA-Stücke abschätzen zu können, wird neben den Proben ein Längenstandard mit definierten Fragmentgrößen aufgetragen. Die 100 bp DNA-ladder (Biolabs) beinhaltet DNA-Stücke der Länge 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 517/500, 400, 300, 200 und 100 bp.

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um aus Midi- bzw. Minipräparationen die erhaltenen DNA-Mengen abschätzen zu können, wird ein Aliquot auf ein analytisches Agarose-Gel aufgetragen. Ebenso wird über ein Agarose-Gel eine DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen analysiert. Je nach Größe der zu analysierenden DNA werden 1 % - 2 % Agarose-Gele erstellt.

10x TPE-Puffer: 20 mM Na₂EDTA
 0.89 M Tris
 2.15 % (v/v) 85 % H₃PO₄
 → pH 8.0 mit H₃PO₄ einstellen

AP-Puffer: 0.25 M Na₂EDTA
 1.2 % (w/v) SDS
 25 % (w/v) Saccharose
 0.1 % (w/v) Bromphenolblau
 → pH 8.0 einstellen mit NaOH

Agarose (Qualex Gold Agarose, Fa. AGS, Heidelberg) wird eingewogen, mit 1x TPE aufgefüllt und unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 65°C wird das Agarose-Gel in eine Flachbettkammer ca. 5 mm hoch gegossen und nach Erstarren mit Laufpuffer (1x TPE) überschichtet.

0.2 µg DNA werden mit QBD auf 10 µl Probenvolumen aufgefüllt und mit 3 µl AP-Puffer versetzt. Die Proben werden gemischt, 3 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt, kurz anzentrifugiert und die Taschen befüllt. Die Auftrennung erfolgt bei 100 V für ca. 1h. Während des Laufes wird der Laufpuffer mittels einer peristaltischen Pumpe umgepumpt, um einen pH-Gradienten zu vermeiden. Die Gelkammer ist auf einer Kühlplatte positioniert, die das Gel während der Elektrophorese auf ca. 14°C kühlt.

Die DNA wird in einer Ethidiumbromid-Lösung 10 min im Dunkeln inkubiert und gründlich mit Wasser gewaschen. Auf dem Leuchttisch sind die DNA-Banden detektierbar.

Längenstandard:

Zur Analyse der DNA Fragmente wurde der GeneRuler™ 1kb DNA ladder (MBI Fermentas) verwendet. Der Marker beinhaltet DNA-Stücke von 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 bp.

2.7.3 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Verwendete Spaltpuffer (10 x):

NE Puffer 2 :	10 mM Tris/HCl (pH 7.9 bei 25°C)
(für StuI, HindIII):	10 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	1mM DTT
Y ⁺ /Tango:	33 mM Tris-Acetat (pH 7.9 bei 37°C)
(für BsuI, NcoI, XhoI, BamHI)	10 mM Mg-Acetat
	66 mM K-Acetat
	0.1 mg/ml BSA
O ⁺ -Puffer:	50 mM Tris/HCL (pH 7.5 bei 37°C)
(für BstXI)	10 mM MgCl ₂
	100 mM NaCl
	0.1 mg/ml BSA
EcoRI-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7.5 bei 37°C)
(für EcoRI):	10 mM MgCl ₂
	100 mM NaCl
	0.02 % Triton X-100
	0.1 mg/ml BSA
AP-Puffer:	0.25 M Na ₂ EDTA
	1.2 % (w/v) SDS
	25 % (w/v) Saccharose
	0.1 % (w/v) Bromphenolblau
	→ pH 8.0 einstellen mit NaOH

1 Unit ist die Menge einer Restriktionsendonuklease, die bei optimaler Spalttemperatur und entsprechendem Spaltpuffer des Enzyms 1 μg einer λ DNA in einer Stunde vollständig spaltet.

Für eine Spaltung mit Restriktionsenzymen werden 0.2 μg Plasmid DNA mit 0.2-2 Units/ μg DNA in dem jeweiligen Spaltpuffer für 1 h bei der optimalen Spalttemperatur in einem 10 μl Ansatz inkubiert. Die Spaltung wird durch Zugabe von 3 μl AP-Puffer abgestoppt.

2.7.4 DNA-Extraktion aus Agarose

Die DNA-Extraktion wird nach dem QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Fa. QIAGEN) durchgeführt. Die Puffer entstammen dem QIAquick DNA Extraction Kit, ihre Zusammensetzung ist nicht angegeben.

Nach Auftrennung der DNA-Stücke durch Gelelektrophorese (vgl. 2.7.2) wird die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit dem 3fachen Volumen QG Puffer aufgefüllt. Man inkubiert bei 50°C für 10 min unter wiederholtem Mischen des Ansatzes. Liegt in dem Ansatz nach der vollständigen Auflösung der Agarose ein zu hoher pH-Wert vor (pH >7.5), wird gegebenenfalls mit 10 μl 3 M NaAc eingestellt. Man fügt ein Gelvolumen Isopropanol hinzu, wodurch die Ausbeute der DNA Fragmente <500 bp und >4 kb erhöht wird. Ein QIAquick Säulchen wird in ein 2 ml Reagiergefäß platziert. Durch Aufbringen der DNA-Lösung und anschließender Zentrifugation (1 min, 13.000 x g) wird die DNA an die Säule gebunden. Anschließend wird nacheinander mit 0.5 ml Puffer QG und 0.75 ml Puffer PE gewaschen, jeweils wie zuvor zentrifugiert und die Durchflüsse verworfen. Anschließend zentrifugiert man nochmals 1 min, um restlichen PE-Puffer zu entfernen. Nach dem Waschschrift wird die Säule auf ein frisches Reagiergefäß platziert und mit 50 μl Puffer EB eluiert (1 min, 13.000 x g). Die aufgereinigte DNA kann direkt zur weiteren Verarbeitung eingesetzt werden.

2.7.5 Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA

Um die Effizienz der Ligation zu erhöhen, wird vorher eine Dephosphorylierung des linearisierten Plasmids durchgeführt. Mittels der *calv intestine alkaline phosphatase* (CIAP) werden die Phosphatgruppen-Gruppen an den 5'-Enden der DNA entfernt und so eine Eigenligation der Rahmen-DNA verhindert.

Phosphatase-Puffer	0.01 M Tris/HCl, pH 7.5
	0.01 M MgCl ₂

Für den Ansatz werden 1-20 pmol DNA Enden einer linearisierten Plasmid-DNA und 0.2 Units Phosphatase in Phosphatase-Puffer aufgenommen und eventuell mit QBD aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Inkubation von 10 min bei 75°C dient der Inaktivierung der Phosphatase. Der so dephosphorylierte Vektor kann direkt in eine Ligation eingesetzt werden.

2.7.6 Ligation

Verwendete Lösungen:

10x T4 DNA Ligase-Puffer:	60 mM Tris/HCl pH 7.5
	60 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	1 mg/ml BSA
	70 mM β-Mercaptoethanol
	1 mM ATP
	20 mM DTT
	10 mM Spermidin

Pro Ligrationsansatz werden ca. 50 ng linearisierter Vektor eingesetzt. Vektor und Insert werden in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 (molares Verhältnis, Vektor:Insert) eingesetzt. Die DNA wird mit 1 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer und 5 Units T4 DNA-Ligase versetzt, mit QBD auf 10 µl aufgefüllt und für 1 h bei 16°C oder 22°C inkubiert. Im Anschluss wird der Ansatz für 10 min auf 65°C erhitzt, um die DNA-Ligase zu inaktivieren.

2.7.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wird nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger und Coulson (1975) durchgeführt. Hierbei wird die DNA-Synthese in Anwesenheit von Didesoxynukleotiden durchgeführt. Diese bewirken durch das Fehlen einer 3'-OH Gruppe den Kettenabbruch im Synthesestrang. Für jede der vier Basen wird ein Ansatz erstellt, der zusätzlich zu den vier Desoxyribonukleotiden (dNTP) jeweils eine Sorte von Didesoxynukleotiden (ddNTP) enthält. Die ddNTPs werden zufällig eingebaut und erzeugen so DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, deren letzte Base jeweils bekannt ist. Die neu synthetisierten DNA-Stränge sind durch Verwendung von α -³⁵S-dATP radioaktiv markiert. Auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel werden die Syntheseansätze nebeneinander aufgetragen und die erhaltenen DNA-Stücke ihrer Länge nach elektrophoretisch getrennt. So

kann aufgrund der unterschiedlichen Laufstrecken die Basenabfolge (komplementär zum Template) abgelesen werden.

Die Sequenzierungen wurden entweder selbst (s.u.) oder bei den Firmen GATC (Konstanz), MWG-Biotech (Ebersberg) oder SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Bei den Sequenzierungen außer Haus werden bei der DNA-Synthese statt radioaktiv markiertem dATP vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt (Prober *et al.*, 1987).

2.7.7.1 Probenvorbereitung

Zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA werden ca. 3 µg DNA aus Plasmid-Midipräparationen (2.6.6) mit 8 µl 2 M NaOH versetzt und mit bidest auf 40 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird gemischt, anzentrifugiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 7 µl 3 M NaAc, 4 µl bidest und 120 µl 96 % Ethanol hinzugefügt und nach dem Mischen für 15 min auf Eis gefällt. Man zentrifugiert 15 min 8000 x g, der Überstand wird abgesaugt und dann mit dem selben Volumen 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es wird für weitere 10 min wie zuvor zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Vakuum getrocknet.

2.7.7.2 Annealing-Reaktion

Annealing Puffer:	1 M Tris/HCl, pH 7.6
	0.1 M MgCl ₂
	0.16 M DTT
T7 Sequenase Reaktionspuffer (5x) (Amersham, Life Science)	0.2 M Tris/HCl pH 7.5
	0.1 M MgCl ₂
	0.25 M NaCl

Die denaturierten und getrockneten Proben werden in bidest gründlich resuspendiert. Der Ansatz wird mit 2 µl (5x)-Reaktionspuffer und 1 pmol Sequenzierprimer versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Danach erhitzt man für 2 min auf 65°C, lässt über einen Zeitraum von 15–30 min auf Raumtemperatur abkühlen, zentrifugiert kurz an, und lagert die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4°C.

2.7.7.3 Markierungs-Reaktion

Nukleotid-Mix	je 1.5 µM dCTP, dGTP, dTTP
---------------	----------------------------

Enzym Verdünnungspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7.5
	5 mM DTT
	100 µg/ml BSA
	5% (v/v) Glycerin

Die 10 µl der Annealing-Reaktion werden mit 1 µl 0.1 M DTT und 2 µl Nukleotid-Mix versetzt und anschließend mit 0.5 µl α -³⁵S-dATP gemischt. Nach Zugabe von jeweils 2 µl T7-Sequenase (1:8 in Enzymverdünnungspuffer) wird die Probe gemischt und genau 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wird sofort die Terminations-Reaktion durchgeführt.

2.7.7.4 Terminations-Reaktion

ddNTP-Mix	je 80 µM dATP, dGTP, dTTP, dCTP
(Amersham, Life Science)	8 µM eines ddNTP
	50 mM NaCl

Stopp-Lösung:	20 mM Na ₂ EDTA
	95% (v/v) Formamin
	0.05% (w/v) Bromphenolblau
	0.05% (w/v) Xylencyanol FF

Für jeden Reaktionsansatz werden 4 Eppendorfreagiergefäße mit 2.5 µl jeweils eines ddNTP-Mixes bestückt und auf 37°C temperiert. Zu den temperierten ddNTP Mixen gibt man 3.5 µl der Markierungs-Reaktion (siehe 2.7.7.3) und inkubiert bei 37°C. Die einzelnen Reaktionen werden jeweils nach genau 5 min mit 4 µl Stopp-Lösung beendet. Bis zur weiteren Verwendung können die Proben bei -20°C gelagert werden. Vor dem Auftrag auf das Sequenziergel (2.7.7.5) werden die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt.

2.7.7.5 Sequenziergel

Das verwendete, keilförmige Sequenziergel besitzt die Dimensionen 40 x 15 cm bei einer Dicke von 0.2 – 1 mm.

Vorbehandlung der Platten:

Lösung I (gelabweisend):	10 % (v/v) Dimethyl-dichlorsilan in Toluol
--------------------------	--

Lösung II	15 ml Ethanol
	60 µl Haftsilan
	300 µl 10 % (v/v) Essigsäure

Die größere Platte wird mit 7.5 ml Lösung I gleichmäßig eingerieben. Für die kleinere Platte verteilt man die Hälfte der Lösung II auf der Glasplatte und verreibt sie vollständig. Nach 10 min wird die restliche Lösung auf das Glas gegeben und ebenfalls gleichmäßig verrieben. Anschließend werden beide Glasplatten mit einem weichen Papiertuch (Kleenex) poliert. Die beiden Platten werden mit den behandelten Seiten nach innen zusammen gebaut und die keilförmigen Spacer so platziert, dass das Gel oben ca. 0.2 mm und unten ca. 1 mm dick wird. Die große Platte wird auf der kleineren so positioniert, dass jeweils oben und unten ein Stück übersteht.

Lösungen für das Sequenziergel:

Sequagel™ (Biozym):	25 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
	8.3 M Harnstoff

10x TBE:	1 M Tris
	0.98 M Borsäure
	25 mM Na ₂ EDTA
	→ filtrieren

Für das Sequenziergel werden 28.5 g Harnstoff eingewogen, mit 7.5 ml 10x TBE und 18 ml SequaGel™ versetzt, auf 75 ml mit bidest H₂O aufgefüllt und im 37°C Wasserbad gelöst. Der Lösung werden 39 µl TEMED und 390 µl (NH₄)₂S₂O₈-Lösung zugesetzt, gemischt und sofort luftblasenfrei in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Man platziert einen Probenkamm mit Auftragstaschen an der dünnen Seite des Gels, fixiert mit Klammern und lässt das Gel über Nacht auspolymerisieren.

Vor dem Probenauftrag wird der Kamm entfernt und die Auftragstaschen mit Laufpuffer (1x TBE) gespült, um Luftblasen und Harnstoff zu entfernen. Danach wird das Gel in eine Elektrophorese-Kammer eingespannt, die Taschen mit ca. 20 µl Auftrags-Puffer befüllt und der Vorlauf über ca. 45 min gestartet. Wenn der Frontmarker (Bromphenolblau) durchgelaufen ist, wird der Gellauf gestoppt. Die Proben werden so aufgetragen, dass die Ansätze mit jeweils denselben Primern nebeneinander positioniert sind. So lässt sich bei der Auswertung die zum Template komplementäre Sequenz leicht ablesen.

Nach Probenauftrag lässt man das Gel bei ca. 1500 V Spannung für ca. 2 h laufen, bis der Frontmarker erneut am Ende des Gels angelangt ist. Die Glasplatten werden getrennt, wobei das Gel auf der mit Haftsilan beschichteten Platte haftet. Das Sequenziergel wird für ca. 1,5 h in 10 %iger Essigsäure gespült, um den Harnstoff aus dem Gel zu lösen. Anschließend wird das Gel unter fließendem Wasser gewaschen, für 1.5 h im 65°C Trockenschrank getrocknet. Zur Autoradiographie wird auf das Gel ein Röntgenfilm aufgelegt, dieser je nach Stärke des Signals zwischen 5 min und 24 h bei RT exponiert und anschließend entwickelt.

2.8 Proteinexpression in *E.coli*

2.8.1 Expressionstest

Um zu testen, ob das gewünschte Protein überhaupt in *E.coli* exprimiert wird, empfiehlt es sich, die Expression vorerst in einem kleineren Maßstab durchzuführen.

Hierzu wird aus einer Einzelkolonie von einer Platte eine 20 ml LB Über-Nacht-Kultur (+Antibiotikum) angeimpft. Am nächsten Tag wird in eine frische 20 ml Kultur überimpft und bei entsprechender Temperatur bis $E_{1cm}^{600nm}=1$ inkubiert. Zur Kontrolle einer möglichen Zunahme der Expression werden vor der Induktion (2.8.3) und während der Expression Proben entnommen und ca. 30 sec bei 8000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 50 µl Auftragspuffer (vgl. 2.10.1.1) pro $E_{1cm}^{600nm}=1$ und pro 0.5 ml Probenvolumen resuspendiert und anschließend zur Analyse über SDS-PAGE nach Laemmli (1970) (2.10.1.1) oder nach Schagger und von Jagow (1987) (2.10.1.2) aufgetrennt.

2.8.2 Fermentation

Werden größere Mengen des gesuchten Proteins benötigt, wird die Überexpression in einem 10 l Fermenter durchgeführt.

Hierzu wird ein 10 l Fermenter zusammengebaut, mit 6.5 l Wasser gefüllt und über Nacht im 120°C Schrank sterilisiert. 20 ml LB (+ Antibiotikum) werden mit einem Klon aus einer frischen Transformation (oder aus einer Glycerinkultur) angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Man verteilt die Über-Nacht-Kultur in 2x 500 ml LB (+Antibiotikum) und lässt die Zellen erneut bei 30°C über Nacht wachsen. Die Vorkulturen werden unabhängig vom *E.coli* Stamm jeweils bei 30°C angezogen, um die Bildung von *inclusion bodies*, die in einem heterologen Expressionssystem auftreten können, möglichst gering zu halten.

PBS	140 mM NaCl/HCl pH 7.3
	2.7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	1.8 mM KH ₂ PO ₄
	10 % (v/v) Glycerin

In das sterilisierte Wasser wird 10x LB eingefüllt und das Medium auf Inkubationstemperatur gebracht. Damit die Temperatur während der Anzucht konstant bleibt, wird der Fermenter über eine integrierte Kühlschlange laufend thermostatisiert. 100 ml der Vorkultur werden für eine Plasmid-Midipräparation eingesetzt und die DNA anschließend sequenziert. Mit den restlichen 500 – 900 ml wird der Fermenter angeimpft und mit 1 M NaOH der pH-Wert auf 7.5 (pH-Streifen) eingestellt. Druckluft wird über eine Glasfritte in den Fermenter eingeleitet, wodurch die Kultur ständig durchmischt und mit Sauerstoff versorgt wird.

Man lässt die Zellen bis $E_{1cm}^{600nm} \approx 1$ wachsen und versetzt mit 200 ml autoklavierter 62.5 %iger (w/v) Glucose-Lösung und 300 ml autoklavierter 33.3 %iger (w/v) Peptone-Lösung und induziert anschließend die Proteinexpression (2.8.3). Für eine spätere Kontrolle der Expression über Polyacrylamidgelelektrophorese (2.10.1.1) werden Aliquots der Zellen vor der Induktion (2.8.3) sowie während der Proteinexpression entnommen. Während der 3stündigen Inkubation wird regelmäßig der pH-Wert kontrolliert und eventuell mit Zugabe von 1 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt. Nach Ablauf der 3 Stunden werden die Zellen bei 8000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen werden in ca. 50 – 100 ml PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die Ausbeute an Zellen (Feuchtgewicht) beläuft sich auf 16 – 36 g.

2.8.3 Induktion der Proteinexpression

Die Induktion der Protein-Expression ist abhängig von den verwendeten Plasmiden, die in Expressionsvektoren transformiert werden. Bei Genen, deren Expression durch den *lac*-Repressor unterdrückt wird, kann durch Zugabe von IPTG, einem Galaktose-Analogen, die Proteinexpression induziert werden. IPTG verändert die Konformation des *lac*-Repressors, so dass dieser nicht mehr an den *lac*-Operator binden kann. Dadurch kann der Transkriptionsstart am Promotor durch eine RNA-Polymerase eingeleitet werden. Die Expression der gewünschten Proteine erfolgte durch Induktion mit 0.3-1mM IPTG.

10 l Fermenter wird 1 ml Säulenvolumen verwendet). Der aufgefangene Durchlauf wird anschließend erneut über die Säule gegeben, um die Ausbeute zu erhöhen. Um unspezifische Bindungen anderer Proteine zu reduzieren, wird das Volumen des Überstandes gemessen und anschließend mit der gleichen Menge Waschpuffer gewaschen.

2.9.3 Abspaltung des GST-Fusionsanteils

Je nach Art des eingesetzten pGEX-Vektors (siehe 2.5.3.4) erfolgt die Trennung des gewünschten Proteins über die Spaltung durch Thrombin (pGEX-2T) oder PreScission Protease (pGEX-6P).

Für die Thrombinspaltung wird das Fusionsprotein mit Elutionspuffer (10 mM Glutathion, 50 mM Tris pH 8.0) in 500 µl Fraktionen von der Säule eluiert. Die Spaltung des GST-*AthSSB-1* wird durch Zugabe von 1.25 units Thrombin pro mg eingesetztem Fusionsprotein gestartet. Bereits nach 15 min ist die gesamte Menge des Fusionsproteins gespalten und die Reaktion muss durch Zugabe von Auftragspuffer (siehe 2.10.1.1) gestoppt werden. Das Spaltprodukt *AthSSB-1* wurde zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt. Bei längerer Inkubation mit der Protease treten Abbaubanden von *AthSSB-1* auf.

Die Verwendung des pGEX-6P Vektors erfordert eine Spaltung mit PreScission Protease. Ein Vorteil liegt darin, dass die Protease ebenfalls an GST fusioniert ist. So kann das Enzym das aufzureinigende Fusionsprotein spalten, während es selbst an Glutathion Sepharose gebunden ist. Durch die eigene Affinität zur Säule befindet sich das Enzym, im Gegensatz zur Thrombinspaltung, nicht im Eluat.

PreScission Spaltpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7.0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT

Für die Spaltung wird das an Glutathion Sepharose 4B gebundene Fusionsprotein mit fünf Säulenvolumen PreScission Spaltpuffer umgepuffert. Zur Spaltung wurden 0.4 – 8 units PreScission Protease pro Milliliter eingesetztem Überstand des Zellaufschlusses (2.9.1) eingesetzt. Die Elution des abgespaltenen Proteins vom Säulenmaterial erfolgt in 0.5 ml Fraktionen mit PreScission Spaltpuffer. Wurde vor dem Zellaufschluss (2.9.1) bereits RNase zugegeben (vgl. 3.3.1.3), so können die Eluate gegen einen gewünschten Messpuffer dialysiert (2.9.5) und anschließend zur Charakterisierung eingesetzt werden.

2.9.4 Affinitätsreinigung über Blue Sepharose

Zur weiteren Aufreinigung des RNA-haltigen Eluates, das nach der Spaltung mit PreScission Protease resultierte, wurde eine Affinitätsreinigung über Blue Sepharose durchgeführt. Vor dem Probenauftrag auf Blue Sepharose Säule wird diese mit dem 10fachen Säulenvolumen PreScission Spaltpuffer (2.9.3) äquilibriert.

Waschpuffer 1
50 mM Tris/HCl pH 7.5
1mM EDTA
10 % (v/v) Glycerin

Waschpuffer 2
0.5 M NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7.5
1mM EDTA
10 % (v/v) Glycerin

Elutionspuffer
4 M Harnstoff
0.5 M NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7.5
1 mM EDTA
10 % (v/v) Glycerin

Die *AthSSB-1* Elutionen von der Glutathion-Sepharose 4B wurden vereinigt, über das Blue Sepharose Säulenmaterial gegeben und mit 10fachen Säulenvolumen Waschpuffer 1 gewaschen. Anschließend wird mit einem Säulenvolumen Waschpuffer 2 gewaschen und das Protein mit Elutionspuffer (4 M Harnstoff) eluiert. Zur Entfernung des Harnstoffs wird gegen einen Harnstofffreien Elutionspuffer dialysiert. Anschließend werden die Proteine mit 40g/100 ml Ammoniumsulfat für 4-8 h bei 4°C ausgefällt und danach abzentrifugiert. Das Pellet wird im gewünschten Messpuffer aufgenommen und anschließend ausreichend dialysiert (2.9.5).

2.9.5 Dialyse von Proteinen

Vorbehandlung der Dialyseschläuche VISKING® (Serva, Heidelberg):

Kochpuffer:
2 % (w/v) NaHCO₃
1 mM EDTA, pH 8.0

Lagerpuffer:	1 mM EDTA, pH 8.0
	10 mM NaN ₃
	20 % (v/v) Ethanol
	10 % (v/v) Glycerin

Die Schläuche werden zweimal in 0.5 l Auskochpuffer aufgekocht. Zwischen dem Pufferwechsel sowie nach Beenden des Kochens, werden die Schläuche mit bidest H₂O gespült. Die Aufbewahrung der Schläuche erfolgt bei 4°C in Lagerpuffer.

Zuerst wird ein genügend großer Dialyseschlauch gründlich mit bidest. H₂O gespült und auf einer Seite verschlossen. Dann wird das zu dialysierende Probenvolumen eingefüllt, der Schlauch verschlossen und der Schlauch in 0.5 l des gewünschten Puffers platziert. Man dialysiert bei 4°C unter ständigem Rühren. Um eine erschöpfende Dialyse zu gewährleisten, wird der Dialysepuffer 2-3 mal gewechselt, wobei der Wechsel jeweils nach ca. 5-8 h (oder über Nacht) erfolgt.

Soll das aufgereinigte Protein für längere Zeit aufbewahrt werden, so wird gegen Aufbewahrungspuffer (1 M NaCl, 20 mM KP_i, pH 7.5, 1 mM EDTA, 60 % (v/v) Glycerin) dialysiert und das Protein bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.10 Protein Charakterisierung

2.10.1 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Zur Auftrennung von Proteingemischen, sowie zur Kontrolle von Proteinaufarbeitung und Reinheit der *Ath*SSB-Proteine werden denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Gelsystem durchgeführt. Abhängig von der Art und Konzentration der Acrylamidlösung, lässt sich die Auftrennung im gewünschten Größenbereich optimieren. SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurden zur Expressionskontrolle sowie zur Aufreinigungs- und Reinheitskontrolle von Proteinen verwendet. SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987) wurden überwiegend bei Western-Blots eingesetzt.

Längenstandard:

Zur Größenabschätzung der Proteine wurde der Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) mit folgenden Molekulargewichten verwendet: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 und 14.4 kDa.

2.10.1.1 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Acrylamid-Lösung (Roth)	30 % (w/v) Acrylamid 0.8 % (w/v) Bisacrylamid
15 % Trenngel:	1.4 ml 1.5 M Tris/HCl pH 8.8 0.54 ml bidest H ₂ O 0.5 ml 1 % (w/v) SDS 2.56 ml 30 % Acrylamid-Lösung → + 10 µl TEMED, + 10 µl 40 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ → sofort gießen
6 % Sammelgel:	0.6 ml 30 % Acrylamid-Lösung 0.38 ml 1M Tris/HCl pH 6.8 0.15 ml 1 % (w/v) SDS 1.82 ml bidest H ₂ O → + 6µl TEMED, + 6 µl 40 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ → sofort gießen
Laufpuffer:	0.025 M Tris 0.191 M Glycin 0.1 % (w/v) SDS
Auftragspuffer:	43.5 % (v/v) Glycerin 0.16 M Tris/HCl pH 6.8 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 2 % (w/v) SDS 0.01 % (w/v) Bromphenolblau
Färbelösung:	42.5 % (v/v) Ethanol (vergällt) 5 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 2 mg/ml (R250) Coomassie (Serva) 0.5 mg/ml (G250) Coomassie (Serva)

Die Gele haben eine Dimension von 8 x 6 cm, wobei sich das Gel in der Höhe aus 5 cm Trenngel und ca. 1 cm Sammelgel zusammensetzt. Die Dicke beträgt ca. 1 cm. Für Gele zur präparativen Proteinspaltung (20 cm x 20 cm) ändern sich die Mengenangaben sowie die Höhe von Trenn- und Sammelgel entsprechend proportional.

Zwischen zwei Glasplatten wird zuerst die Lösung des Trenngels ca. 5 cm hoch gegossen und mit bidest H₂O überschichtet. Man wartet bis die Lösung auspolymerisiert ist, entfernt das Wasser und füllt den Rest mit der Lösung des Sammelgels auf. Ein Probenkamm wird zwischen den Platten in das soeben gegossene Sammelgel platziert und bis zur vollständigen Polymerisierung des Gels fixiert. Anschließend wird das Gel senkrecht in der Weise in die Gelkammer eingespannt, dass die Probenauftragstaschen oben liegen und zudem an der Kathode positioniert sind. Die Proben werden mit Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95 min aufgeköcht und auf Eis abgeschreckt. Bei vorangegangener Fällung der Proteine mit TCA wird der Auftragspuffer zur Neutralisation mit 20 % (v/v) 2 M Tris versetzt. Das SDS im Auftragspuffer denaturiert die Proteine, es entstehen SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladung- zu Masse-Verhältnis. Ihre elektrophoretische Auftrennung erfolgt nach Auftrag in Laufpuffer bei konstanter Stromstärke von 32 mA bis der Frontmarker (Bromphenolblau) das Ende des Gels erreicht hat.

Zum Anfärben der Proteine wird das Gel für ca. 5 min in Coomassie-Färbelösung gekocht. Eine anschließende Entfärbung erfolgt durch Kochen in 7 % (v/v) Essigsäure. Zur Aufbewahrung werden die entfärbten Gele für 1.5 h in Schrumpflösung (55 ml Ethanol, 2 ml 87 % Glycerin, 43 ml bidest) geschüttelt. Anschließend werden die Gele zwischen Papier und Einmachfolie in einem Vakuumtrockner getrocknet.

2.10.1.2 SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987)

Acrylamid-Lösung (Roth)	30 % (w/v) Acrylamid
	0.8 % (w/v) Bisacrylamid
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl pH 8.45
	0.3 % (w/v) SDS
16.5 % Trenngel:	2.75 ml Acrylamid-Lösung
	1.7 ml Gelpuffer
	0.55 ml bidest H ₂ O

6 % Sammelgel:	0.6 ml Acrylamid-Lösung 0.75 ml Gelpuffer 1.65 ml bidest H ₂ O
Kathodenpuffer:	0.1 M Tris/HCl pH 8.25 0.1 M Tricin 0.1 (w/v) % SDS
Anodenpuffer:	0.2 M Tris/HCl pH 8.9

Das Gießen des Gels sowie die Durchführung der SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987) wird wie bei SDS-PAGE nach Laemmli (1970) (2.10.1.1) beschrieben durchgeführt.

2.10.2 Protein-Konzentrationsbestimmung mit UV/VIS-Spektroskopie

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden an einem Jasco V-560 UV7VIS Spectrophotometer (ein Zweistrahlphotometer mit Doppelmonochromator) durchgeführt. Für die Aufnahme von Absorptionsspektren wird zuerst die Absorption des Puffers als Basislinie gemessen, anschließend die Absorption der Proteinlösung, die um die Pufferabsorption korrigiert wird. Anhand der aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Extinktionskoeffizienten der Proteine (Bredderman, 1974), lässt sich über das Lambert-Beer'sche Gesetz die Protein-Konzentration berechnen. Die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen beziehen sich jeweils auf das *AthSSB-1* Monomer.

Extinktionskoeffizienten der monomeren *AthSSB*-Proteine:

<i>AthSSB-1</i> (full length; 201 AS)	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$: 22194 M ⁻¹ cm ⁻¹
<i>AthSSB-1</i> (N-terminal verkürzt; 174 AS)	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$: 22194 M ⁻¹ cm ⁻¹
<i>AthSSB-2</i> (full length; 217 AS)	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$: 13374 M ⁻¹ cm ⁻¹
<i>AthSSB-2</i> (N-terminal verkürzt; 195 AS)	$\epsilon_{280 \text{ nm}}$: 12094 M ⁻¹ cm ⁻¹

2.10.3 Quervernetzungsexperimente (Crosslink)

Crosslinks können Aufschluss über den Oligomerisierungszustand eines Proteins geben. Bei Verwendung von Dimethylsuberimidat (DMS) werden die freien Aminogruppen des Proteins, bevorzugt die der Lysinreste, kovalent miteinander verbunden, so dass eine Vernetzung der Untereinheiten möglich ist (Davies und Stark, 1970). Nach einer anschließenden Denaturierung lassen sich auf einem Polyacrylamid-Gel unterschiedliche Vernetzungen

nachweisen, wodurch auf den Oligomerisierungszustand Rückschlüsse gezogen werden können.

verwendete Lösungen:

Tra Puffer:	0.4 M (7.4 g) Triethanolaminhydrochlorid → add 100 µl bidest → pH 8.5 einstellen mit NaOH
DMS-Lösung	10 mg/ml DMS in bidest

Die Ansätze werden so gewählt, dass 10 µg Protein, 0.2 M Tra Puffer und 3 mg/ml DMS vorliegen. Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne Zugabe von DMS vorbereitet. Die Proben werden für 3 Stunden auf Eis inkubiert, durch Zugabe eines äquivalenten Volumens 20 % TCA gefällt und mit 10 µl AP/Tris versetzt. Zur Analyse des Crosslinks werden die Proben auf ein 12 %iges Polyacrylamid (2.10.1.1) aufgetragen.

2.10.4 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe und Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtsläufe werden in einer analytischen Ultrazentrifuge XL-A (Fa. Beckmann) durchgeführt. Bei dieser Zentrifuge läuft der Rotor im Vakuum, über ein eingebautes Photometer wird während der Zentrifugation orts aufgelöst die Veränderung der Extinktion gemessen. Die Messungen erfolgen bei 20°C in 75 mM NaCl, 20 mM KP_1 , pH 7.4. Durch Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugationen lässt sich die Molmasse eines Proteins bestimmen, Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugationen geben zudem Hinweise über die Form des Moleküls.

Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugation:

Bei Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtsläufen wird bei mittleren Drehzahlen (hier 23.000 rpm) zentrifugiert. Die Proben befinden sich dabei in 6 Kanal-Zellen, wobei zu jeder Probe ein Referenzwert (Puffer) mitgeführt wird. Die Proben werden solange zentrifugiert, bis die Sedimentation der in Lösung befindlichen Teilchen im Gleichgewicht zur Diffusion der Teilchen steht. Die Dauer bis zur Einstellung eines solchen Gleichgewichtes ist abhängig von Drehzahl und Größe der Teilchen und dauert oft zwischen 12-16 h. Wenn über einen Zeitraum von ca. 12 h der Konzentrationsverlauf in der Zelle unverändert bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass ein Gleichgewicht vorliegt. Die Form der Teilchen spielt dann keine Rolle. Die Extinktion der Probe wird im Gleichgewicht über mehrere Stunden

wiederholt gemessen. Anschließend wird zur Bestimmung der Pufferabsorption die Probe bei 44.000 rpm absedimentiert. Dann kehrt man zur ursprünglichen Drehzahl zurück und misst in der Nähe des Meniskus die Absorption der proteinfreien Lösung.

Der Konzentrationsverlauf in der Zelle im Gleichgewicht wird bei Vorliegen einer einzigen Spezies beschrieben durch

$$\frac{\partial \ln c}{\partial x^2} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{2RT} \omega^2$$

mit c = Proteinkonzentration, x = Ort in der Zelle, ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors, M = Molmasse, \bar{v} = partielles spezifisches Volumen, ρ = Dichte des Lösungsmittels, R = Gaskonstante und T = Temperatur. Zur Auswertung der UZ-Gleichgewichtsläufe dient das institutsinterne Programm BPCFit (Kindler, 1997). Vor der eigentlichen Auswertung wird für die Messdaten, die den Konzentrationsverlauf der Probe in der Zelle darstellen, der auszuwertende Datenbereich festgelegt. Anschließend wird aus der Pufferabsorption nahe dem Meniskus, wo der Konzentrationsverlauf noch flach ist, die Nullabsorption festgelegt. Alle Messdaten, die vor Erreichen des Gleichgewichtes aufgenommen wurden, bleiben unberücksichtigt, die zeitlich nachfolgenden Daten, bei denen sich der Konzentrationsverlauf nicht mehr ändert, werden gemittelt. Für eine Auswertung mit mehreren Spezies wird die nachfolgende Gleichung zugrunde gelegt, die die akkumulierten Messdaten mit einer theoretischen Kurve beschreiben soll

$$A(x) = \sum_{i=1}^n c_i^0 \varepsilon_i e^{\frac{M_i(1-\bar{v}_i\rho)}{2RT}(x^2-x_0^2)\omega^2}$$

mit n = Anzahl der Spezies, c^0 = Proteinkonzentration am Meniskus, x_0 = Meniskus, ε = Extinktionskoeffizient der jeweiligen Spezies. $A(x)$ ist hierbei die gemessene Absorption als Funktion des Ortes, zur Umrechnung in eine Konzentrationsverteilung wird daher der Extinktionskoeffizient mit angegeben. Durch iteratives Anpassen der theoretischen Kurve an die Messdaten werden die Werte für M und c^0 ermittelt. In dieser Arbeit kamen folgende Modelle zur Anwendung:

- (1) in der Lösung befindet sich nur eine Spezies (eine Molmasse; $n=1$):
- (2) in der Lösung befinden sich zwei Spezies (zwei Molmassen; $n=2$), die jedoch nicht miteinander reagieren: zwei Molmassen werden für die Auswertung vorgegeben.
- (3) Dimerisierungsmodell ($2M \xrightleftharpoons{K} M_2$): in der Lösung liegen Monomer und Dimer im Gleichgewicht vor. Die Auswertung erfolgt mit $n=2$ unter der Voraussetzung, dass das

Massenwirkungsgesetz an allen Orten der Zelle gültig ist. Aus dieser Anpassung resultiert eine Assoziationskonstante K , da im Gleichgewicht zusätzlich die Bedingung

$$\frac{c_{M_2}}{(c_M)^2} = K$$

gilt.

Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation:

Für Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe werden sektorförmige Zellen verwendet. So kann während der Zentrifugation keine Sedimentation gegen die Wand der Zelle stattfinden. Zu Beginn sind die Zellen homogen mit der Probenlösung gefüllt, in einer benachbarten Zelle befindet sich die entsprechende Referenzlösung (Puffer) für die Probe. Es wird mit hohen Drehzahlen zentrifugiert (ca. 40.000 bis 60.000 rpm). Während der Zentrifugation beobachtet man die Wanderungsgeschwindigkeit der Grenzschicht, die sich mit der Zeit vom Meniskus wegbewegt. Über die Geschwindigkeit der Grenzschichtwanderung lässt sich der Sedimentationskoeffizient (s -Wert) des sedimentierenden Teilchens bestimmen. Die Definition des s -Wertes ist mit den entsprechenden Parametern gegeben durch

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_L)}{N_A f}$$

mit u = Wanderungsgeschwindigkeit des Makromoleküls, ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors, r = Abstand zum Rotormittelpunkt, M = Molmasse, \bar{v} = partielles spezifisches Volumen, ρ_L = Dichte des Lösungsmittels, N_A = Avogadrozahl und f = Reibungskoeffizient. Mit Hilfe der Stokes-Gleichung $f_{Kugel} = 6\pi\eta r_{Kugel}$ lässt sich in Kombination mit der obigen Gleichung der maximale s -Wert bestimmen, den ein Molekül bei gegebener Molmasse einnehmen kann. Über

$$r_{Kugel} = \left(\frac{3V_{Kugel}}{4\pi} \right)^{1/3} \quad \text{und} \quad V_{Kugel} = \frac{M\bar{v}}{N_A}$$

ergibt sich

$$s_{Kugel} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_L)}{N_A 6\pi\eta \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_A} \right)^{1/3}}$$

Das Verhältnis s_{Kugel} zu $s_{20,w}$ stellt den Perrin-Faktor dar, der einen Anhaltspunkt über die Abweichung des Teilchens von der Kugelform gibt.

Für die Auswertung von UZ-Sedimentationsläufen wurde das Programm SEDFIT (Schuck, 2000) verwendet. Die Positionierung von Meniskus und Boden der Zelle sowie der Auswertebereich der Messdaten wird manuell festgelegt. Weiterhin wird ein Formparameter (Perrin-Faktor) vorgegeben, dessen Wert bei der nachfolgenden Auswertung in den Diffusionskoeffizienten (D) einfließt. Die Auswertung selbst erfolgt mit Hilfe der Lamm'schen Differentialgleichung (Lamm, 1929)

$$\frac{\partial \chi(r,t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial \chi(r,t)}{\partial r} - s\omega^2 r^2 \chi(r,t) \right]$$

Die Absorption als Funktion von Ort und Zeit wird in SEDFIT über

$$a(r,t) = \int c(s) \chi(s, D(s), r, t) ds + \varepsilon$$

definiert (Schuck, 2000), (Lebowitz *et al.*, 2002). Dabei stellt $a(r,t)$ die ermittelten Daten des Sedimentationslaufes dar, $c(s)$ die Konzentration der Spezies, deren s-Werte zwischen s und s+ds liegen, und $\chi(s, D(s), r, t) ds$ die Lösung der oben beschriebenen Lamm'schen Differentialgleichung. Die ermittelten s-Werte beziehen sich auf den jeweiligen Puffer, in dem sie bestimmt wurden. Damit alle s-Werte unabhängig vom jeweiligen Messpuffer vergleichbar sind, werden sie auf $s_{20,W}$ (s-Wert in H₂O und 20°C) korrigiert

$$s_{20,W} = s_{T,P} \frac{\eta_{T,P}}{\eta_{20,W}} \cdot \frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20,W}}{(1 - \bar{v}\rho)_{T,P}}$$

mit η =Viskosität. Die Indices T,P stehen dabei für Temperatur und Pufferbedingungen.

Die Verwendung von SEDFIT liefert durch die Berücksichtigung der Diffusionsverbreiterung schmale Peaks in der s-Wert Verteilung. Enthält die Probe ein Gemisch aus mehreren Spezies, so lassen sich deren s-Werte meistens besser auftrennen.

2.10.5 Fluoreszenz-Titrationsen

Fluoreszenz-Titrationsen werden an einem Schoeffel RRS 1000 Spektralfluorimeter bei 22 °C mit einer Excitationswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 350 nm durchgeführt (vgl. Abbildung 7). Als Lichtquelle dient eine 1000 Watt Xenon-Hochdrucklampe. In Anregungsrichtung passiert das Licht zwei Monochromatoren (MC), einen weiteren in Emissionsrichtung, die Spaltbreiten (SP) betragen 2 mm. Etwa 10 % des Anregungslichtes werden in diesem Gerät durch eine Referenzküvette (R) mit hochkonzentrierter Rhodamin-B Lösung geleitet, das restliche Anregungslicht strahlt durch

die Messküvette (M). Die Fluoreszenz von Mess- und Referenzlösung werden getrennt detektiert, als Messgröße dient der Quotient aus Mess- und Referenzsignal.

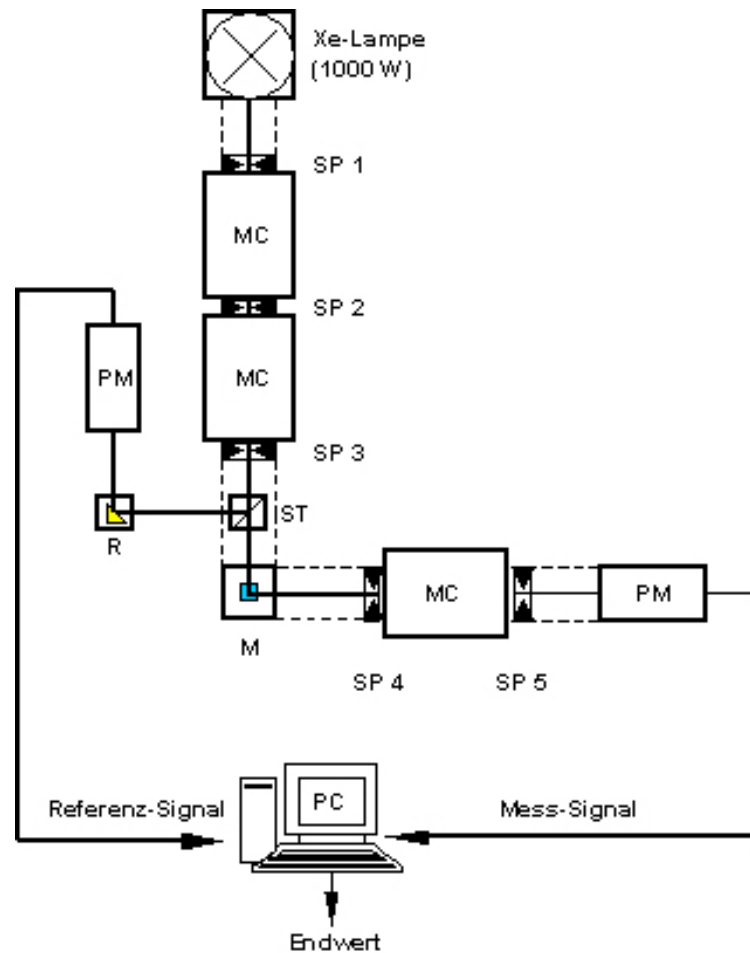


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Schoeffel-Fluorimeters (Bild: G. Witte). Die Anregung erfolgt durch eine Xenon-Hochdrucklampe, die Fluoreszenz wird im rechten Winkel zur Anregung gemessen. M = Messküvette mit Probe, die über den Küvettenhalter thermostatisiert und mit einem Rührfisch durch einen integrierten Magnetrührer ständig gerührt werden kann, MC = Monochromator, PM = Photomultiplier, R = Referenz-Küvette mit Rhodamin B-Lösung, SP = Spalt, ST = Strahlteiler. Einzelheiten siehe Text.

Die Fluoreszenz-Titrationen wurden als „inverse“ Titrationen durchgeführt. Dabei wird der Ligand (*AthSSB-1*) in der Messküvette vorgelegt und mit dem Gitter (poly(dT)) titriert. Eine „normale“ Titration beinhaltet hingegen eine Vorlage des Gitters, zu dem der Ligand schrittweise zugegeben wird.

Für eine Titration werden 600 µl Proteinlösung in einer Halbmikro-Fluoreszenz-Rührküvette (Fa. Hellma) vorgelegt. Über eine Titrationsvorrichtung mit Hamiltonspritze werden gleichbleibende Volumina der Titrationslösung zur Proteinlösung gegeben. Nach Zugabe wird mit der Messung jeweils gewartet, bis sich das Messsignal nicht mehr verändert (1-

2 min). Während des Titrationsablaufes wird die Messlösung kontinuierlich gerührt. Wegen der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz wird die Messküvette gleichbleibend auf 22°C thermostatisiert. Die Proteinkonzentrationen werden so eingestellt, dass ihre Extinktion nicht über $E_{1\text{cm}}^{280\text{nm}} = 0.05$ liegt. Dadurch wird verhindert, dass ein Absinken der Fluoreszenz aufgrund eines Inner-Filter-Effektes zustande kommt.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Titrationsen erfolgt mit FLUTIT (ein institutsinternes, von J. Greipel entwickeltes Programm). Die Bedeckungslänge (n) und die Bindungsaffinität ($K_{\text{ass}} \cdot \omega$) wurde nach Schwarz und Watanabe (1983) unter Annahme einer in Analogie zu EcoSSB moderaten Kooperativität (ω) bestimmt (Greipel *et al.*, 1987).

2.10.6 Kinetische Untersuchungen

Messpuffer: 75 mM NaCl
20 mM KPi , pH 7.4
500 ppm Tween

2.10.6.1 Stopped-Flow-Kinetik

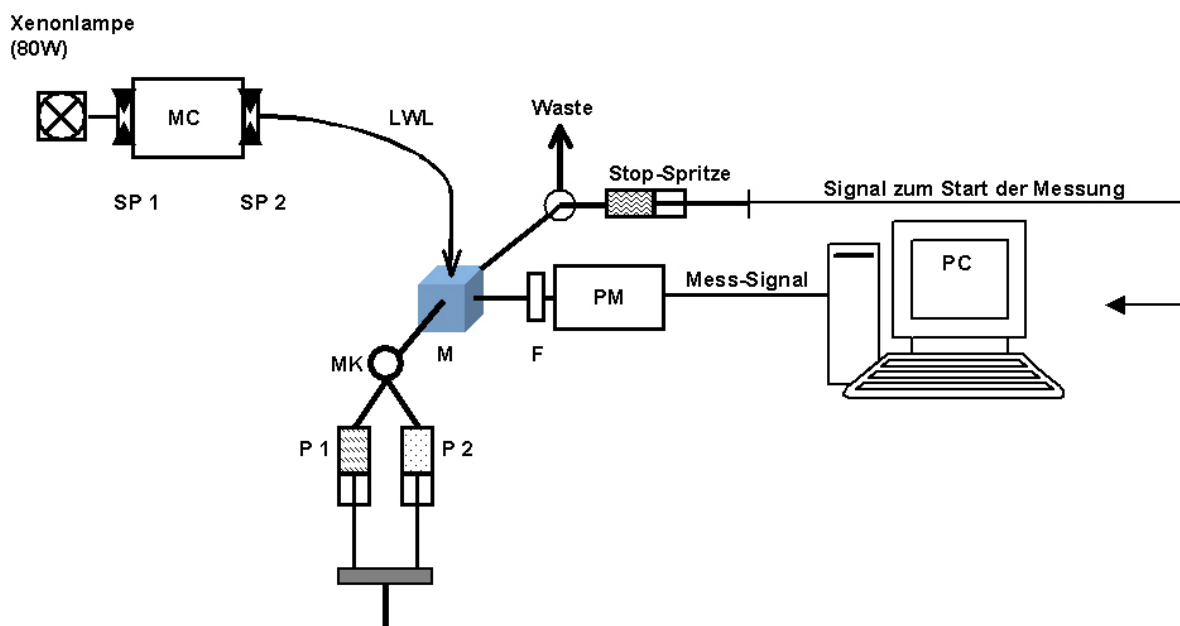
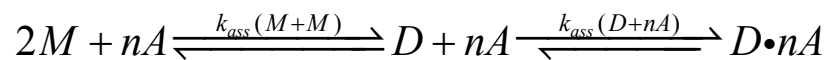


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Fluoreszenz-Stopped-Flow Gerätes (Bild: G. Witte). Die Proben (P1, P2) werden mittels Druckluft aus den Spritzen durch eine Mischkammer (MK) in die Messküvette (M) „geschossen“. Das vorherige Volumen der Messküvette wird in die Stoppspritze gedrückt und durch den Anschlag der Spritze am Trigger die Messung gestartet. Die Reaktionslösung wird über eine Lichtquelle angeregt und die Fluoreszenz über einen Photomultiplier (PM; mit Filter (F)) detektiert. LWL = Lichtwegleitung, MC = Monochromator, SP = Spalt. Einzelheiten vgl. Text.

Um eine sehr schnelle Reaktion zweier Bindungspartner untersuchen zu können, werden die Proben mittels Stopped-Flow-Kinetik untersucht. Dabei werden zwei Lösungen, die die jeweiligen Reaktionspartner enthalten, sehr schnell gemischt und die Fluoreszenzänderung der Probe über die Zeit beobachtet.

Die kinetischen Bindungsstudien wurden am Fluoreszenz-Stopped-Flow π^* -180 (Applied Photophysics) mit poly(dT) (Konzentration in Nukleotiden) und *AthSSB-1* (in Monomeren) im molaren Verhältnis von 8:1 durchgeführt. Die Proben werden jeweils in eine Probenspritze gefüllt. Beim Auslösen eines Schusses werden gleiche Volumina beider Proben sehr schnell durch eine Mischkammer in die Messküvette gedrückt. Durch ein begrenztes Volumen der Stopp-Spritze wird der Fluss der Reaktanten gestoppt, wobei über einen durch die Stopp-Spritze ausgelösten Trigger die Messung der Kinetik gestartet wird. Die Bindung von *AthSSB-1* an poly(dT) wird durch die Änderung der Fluoreszenz detektiert. In Anegungsrichtung passiert das Licht einer Xenonlampe einen Monomchromator (Excitationswellenlänge 295 nm), die Fluoreszenz wird senkrecht zur Anregung durch einen Emissionsfilter WG320 nm über einen Photomultiplier detektiert.

Für die Auswertung mit dem Programm BPCFit (Kindler, 1997) wurde ein Modell eines SSB-Dimers mit partieller Dissoziation zugrunde gelegt:



mit M = *AthSSB-1* Monomer

D = *AthSSB-1* Dimer

n = Anzahl der Nukleotide, an die ein *AthSSB-1* Dimer binden kann

A = poly(dT)

In diesem Modell bilden zwei *AthSSB-1* Monomere ein Dimer, wobei nur die dimere Form des Proteins in der Lage ist, an einzelsträngige Nukleinsäure (hier poly(dT)) zu binden. Die einzelnen Monomere binden hingegen nicht an poly(dT). Zur Auswertung wird sowohl die Gleichgewichtskonstante zwischen Monomer und Dimer (K_{ass}) als auch die Nukleotidanzahl (n), an die ein Dimer binden kann vorgegeben. Beide Parameter wurden zuvor in UZ-Gleichgewichts-Experimenten (K_{ass}) bzw. Fluoreszenz-Titrationen (n) ermittelt.

2.10.6.2 Langzeitkinetik

Die Langzeitkinetik wurde am Schoeffel RRS 1000 Spektralfluorimeter bei 20°C mit einer Excitationswellenlänge von 295 nm durchgeführt. Die Emission erfolgte bei 350 nm. In der

Messküvette werden 600 μl *AthSSB-1* in Messpuffer vorgelegt und das Fluoreszenzsignal gemessen. Anschließend werden 100 μl poly(dT) dazu gegeben, wobei die Konzentrationen so gewählt wurden, dass in der Messküvette 0.8 μM *AthSSB-1* und 6.4 μM poly(dT) vorliegen. Die Messung der Kinetik wird möglichst zeitgleich mit der Zugabe von poly(dT) gestartet. Vor und während der Kinetikmessungen wird die Probe mit einem Rührfisch über einen Magnetrührer gerührt. Die erste Fluoreszenzmessung wurde 1 s nach Starten des Programms aufgenommen, die Abstände zwischen den weiteren Messungen vergrößerten sich dann jeweils um den Faktor 1.1. Die gesamte Messdauer betrug ca. 4 h. Der Lichtweg ist bei dieser Versuchsdurchführung, anders als bei der Stopped-Flow-Kinetik, nur während der Messung geöffnet.

2.11 Immunologische Methoden

2.11.1 Antikörper

Die Antikörper gegen die SSB-Proteine sind polyklonale, aus Kaninchen gewonnene Antikörper (vgl. 2.11.2).

Anti-GST-ScmtSSB (U. Curth, Hannover)

Anti-*HsmtSSB* (Curth, 1993)

Anti-*EcoSSB* (U. Curth, Hannover)

Anti-AthP-1.1 (diese Arbeit)

Anti-AthP-1.2 (diese Arbeit)

Anti-*AthSSB-1* (diese Arbeit)

Anti-*AthSSB-2* (diese Arbeit)

Ziege Anti-Kaninchen gekoppelt an alkalische Phosphatase (Bio-Rad Laboratories)

Ziege Anti-Kaninchen, biotinyliert (Vector Laboratories)

Anti-Cytochromreduktase 1 (H.-P. Braun, Hannover)

Anti-Cytochromreduktase 2 (H.-P. Braun, Hannover)

2.11.2 Antiserumgewinnung

Für immunologische Untersuchungen wurden polyklonale Antikörper aus Kaninchen hergestellt. Als Antigen dienten dabei sowohl synthetische Peptide gekoppelt an KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) als auch rekombinante Proteine. Für die Qualität des Antikörpers spielt die Reinheit des Antigens eine entscheidende Rolle. Die Proteinpräparationen werden daher in einem präparativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch

aufgetrennt, die entsprechende Bande, die als Antigen eingesetzt werden soll, ausgeschnitten und die Gelstücke bis zur Immunisierung bei -20°C gelagert. Für die Immunisierung und die Boosts werden jeweils ca. 0.3 mg Antigen pro Kaninchen eingesetzt.

verwendete Lösungen:

komplettes Freund'sches Adjuvans: 1 mg *Mycobacterium tuberculosis* (hitzeinaktiviert und getrocknet) in 1 ml inkomplettem Freund'schem Adjuvans

inkomplettes Freund'sches Adjuvans: 85 % (v/v) Paraffinöl
15 % (v/v) Mannit Monooleat

Die Gelstücke werden aufgetaut, mit ca. 0.8 ml isotonischer Kochsalzlösung versetzt und mit einem Enzymspatel zerrieben. In zwei 2 ml Luer Lock Spritzen wird die Suspension mittels eines 3-Wege-Hahns mit ca. 0.8 ml kompletten Freund'schem Adjuvans rasch gemischt bis eine stabile Emulsion entsteht. Dies ist der Fall, wenn ein Tropfen der Emulsion auf Wasser für mehrere Sekunden stabil bleibt. Man immunisiert die Kaninchen mit ca. 1 ml einer stabilen Öl-in-Wasser Emulsion in dem man die Lösung an ca. 5-10 verschiedenen Stellen dorsal, subcutan injiziert. Vorher wird den Tieren zur Kontrolle des Antikörpertiters ca. 10 ml Präimmunserum aus der Ohrarterie entnommen. Ca. 4-6 Wochen nach der Immunisierung wird Kontrollblut entnommen und die Kaninchen werden wie bei der ersten Immunisierung geboostert. Hierbei wird anstelle von kompletten Freund'schem Adjuvans, inkomplettes Adjuvans eingesetzt. Nach weiteren 4-6 Wochen wird erneut wie zuvor geboostert und Kontrollblut entnommen. Je nach Qualität des Antikörpertiters kann in gleichem Zeitabstand ein drittes Mal geboostert werden. 12 Tage nach dem letzten Boost werden die Kaninchen sediert und das Blut (ca. 50-70 ml) durch Herzpunktion entnommen. Das Immunisieren der Tiere mit Antigen Lösung, die Blutentnahme sowie die Sedierung der Tiere wurde durch Mitarbeiter des zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Zur Gewinnung der Antiseren lässt man das Blut 1-2 h bei 37°C stehen, löst anschließend den Blutpfropf mit einer Pasteurpipette von der Wandung und vervollständigt die Gerinnung bei 4°C über Nacht. Der Überstand wird dekantiert und bei 4°C mit $5434 \times g$ für 5 min abzentrifugiert. Zur Komplement-Inaktivierung wird der Überstand 20 min bei 56°C inkubiert. Die Antiseren werden in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.11.3 Proteinnachweis durch Westernblot

Zur spezifischen Detektion von Proteinen werden diese mit Hilfe des Westernblots von einem Gel auf eine Membran immobilisiert. Durch Aufbringen von Milchpulver werden alle verbleibenden freien Bindungsstellen der Membran aufgefüllt (geblockt). Anschließend wird mit einem primären Antikörper (Antiserum) inkubiert. Ein gegen den F_C Teil des primären Antikörpers gerichteter sekundärer Antikörper wird aufgebracht, der wiederum an alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Das Enzym spaltet CDP-Star (Roche, Mannheim), ein ultrasensitives und schnelles Chemilumineszenz-Substrat für alkalische Phosphatase.

Verwendete Lösungen:

10x Blotpuffer	0.25 M Tris 1.92 M Glycin 0.3 % (w/v) SDS
TBS	20 mM Tris/HCl pH 7.5 0.5 M NaCl
TBST	20 mM Tris/HCl pH 7.5 0.5 M NaCl 0.05 % Tween 20
AP-Puffer	0.1 M Tris/HCl pH 9.5 0.1 M NaCl 5 mM MgCl ₂
NBT-Lösung	50 mg Nitroblue Tetrazolium Salz in 1 ml 70 % (v/v) N,N-Dimethylformamid → unter Lichtausschluss bei 4 °C lagern
BCIP-Lösung	50 mg 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-3-Phosphat in 1 ml N,N-Dimethylformamid → unter Lichtausschluss bei 4 °C lagern

Die zu prüfenden Proben werden über ein 15 % SDS-PAGE nach Laemmli (1970) (2.10.1.1) oder 16.5 % SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987) (2.10.1.2) bei 32 mA

elektrophoretisch getrennt. Für den Blot werden 7 Lagen Blotpapiere (Schleicher & Schüll GB003) der Größe 5.5 cm x 10 cm übereinander gestapelt. Das Sammelgel wird vom Trenngel getrennt und zur Orientierung die rechte untere Ecke des Trenngels abgeschnitten. Das Gel wird auf die Blotpapiere gelegt, darauf eine PVDF Membran (Fa. Immobilon, 45 µm Poren) aufgebracht und darüber weitere 7 Lagen Blotpapier geschichtet. Anschließend wird alles zwischen einer Edelstahl- und einer Platinplatte als „Sandwich“ zusammengebaut. In der Blotkammer wird das „Sandwich“ so positioniert, dass die Membran zur Anode ausgerichtet ist. Bei 250 mA werden die Proteine 30-45 min senkrecht zur Laufrichtung der SDS-PAGE (2.10.1) auf die PVDF Membran geblottet. Hierbei werden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Membran immobilisiert. Anschließend wird die Membran 1 h mit TBS + 1 % (w/v) Milchpulver (Fa. Bio-Rad) bei Raumtemperatur geblockt.

10 ml TBS + 1 % Milchpulver werden mit 10 µl des primären Antikörpers versetzt. Die Membran wird mit der Antikörper-Lösung bedeckt und über Nacht bei 4°C auf einer Wippe geschüttelt. Die Membran wird gründlich mit bidest gespült und anschließend 3x mit TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen, Alkalische Phosphatase gekoppelt, BioRad) wird 1:2000 in TBS mit 1% Milchpulver verdünnt und die Membran damit 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wird gründlich erst mit bidest und anschließend 3x mit TBST gewaschen, 5 min in AP-Puffer inkubiert und weitere 5 min mit CDP-Star Lösung benetzt. Die Bandendetektion ist bei Auflegen eines Röntgenfilmes aufgrund der Chemilumineszenz möglich.

Für eine colorimetrische Detektion der mit alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpern wird eine Färbelösung mit 33 µl BCIP-Lösung und 66 µl NBT-Lösung in 10 ml AP-Puffer gemischt. Die zuvor mit AP-Puffer behandelte Membran wird in der Färbelösung inkubiert, wobei die Farbstoffe durch die Phosphatase umgesetzt werden. Man inkubiert bis eine ausreichende Färbung der Banden erreicht ist, die Reaktion wird mit H₂O abgestoppt.

Längenstandard:

Damit die Banden des Markers, der bei der Gelelektrophorese mit aufgetragen wird, nach dem Blotten auf der Membran sichtbar sind, wird ein Rainbow Marker (Amersham Life Science) verwendet, dessen Proteine mit Farbstoffen fusioniert sind. Die Größen der Proteinbanden lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Farben leicht unterscheiden. In den Westernblots wurde der RPN 800 Full Range Rainbow Marker mit folgenden Größen: 250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 15 bzw. 10 kDa und der High Range Rainbow Marker mit 220, 97, 66, 45, 30, 20.1, 14.3 kDa Fragmenten aufgetragen.

2.11.4 Proteinnachweis über 2D-Gel (IEF/SDS-PAGE) und Westernblot

Die Anzucht der *Arabidopsis* Zellkultur, die Mitochondrienpräparation sowie die Durchführung des 2D-Gels erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiter der Abteilung für angewandte Genetik, Universität Hannover, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Braun.

Der Ablauf der Mitochondrienpräparation wird hier nur kurz skizziert, für eine detaillierte Beschreibung sei auf Werhahn *et al.* (2001) verwiesen. *Arabidopsis* Zellkulturen werden im Dunkeln bei 24-26°C unter leichtem Schütteln angezogen. Ca. 700 g *Arabidopsis* Zellen (Ausbeute daraus ca. 1 g Mitochondrien) werden gefiltert und in „grinding buffer“ (450 mM Suc, 1.5 mM EGTA, 0.2% BSA, 0.6% PVP 40, 10 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 15 mM MOPS/KOH, pH 7.4) aufgenommen. Die Zellen werden homogenisiert und die Mitochondrien durch mehrfache Zentrifugationsschritte (2x 3.000xg, 1x 17.000xg) im Pellet angereichert. Die Mitochondrienfraktion wird dann in Waschpuffer (300 mM Suc, 1mM EGTA, 0.2 mM PMSF und 10 mM MOPS/KOH pH 7.2) resuspendiert und auf einen 3 Stufen-Percoll-Dichtegradienten (18 %, 23 %, 40 %) geschichtet. Anschließend zentrifugiert man 45 min bei 70.000xg. Die Mitochondrien werden aus dem 23%/40% Übergangsbereich isoliert. 1 g Mitochondrien liefern ca. 100 mg mitochondrielle Proteine. 1 mg der Proteine aus Mitochondrien werden anschließend nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Bereich von pH 3-10 separiert (isoelektrische Fokussierung, IEF) (Kruft *et al.*, 2001). In der zweiten Dimension werden die Mitochondrienproteine senkrecht zur IEF in einer SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wird das Gel mit Coomassie gefärbt. Alle Proteine mit demselben isoelektrischen Punkt liegen nach der zweiten Dimension untereinander. In einem Parallelansatz wird die gleiche Prozedur verfolgt nur dass hier nach der SDS-PAGE die Proteine im Westernblot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden. Die so vorbehandelten Membranen wurden für eine nachfolgende Immunfärbung zur Verfügung gestellt.

Die Behandlung mit *AthSSB*-Antikörpern wurde selbst durchgeführt und erfolgte nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-P. Braun und den Produkthinweisen der Fa. Vector Laboratories, Inc., USA (Vectastain ABC Kit).

Verwendete Lösungen:

TTBS	0.1 M Tris/HCl (pH 7.4)
	0.1 % Tween 20
	0.155 M NaCl

DAB	1g DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat) in 25 ml H ₂ O
Entwickler (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)	0.1 M Tris/HCl (pH 7.4) 0.4 mg/ml NiCl ₂ 30 µl 30 % H ₂ O ₂ 1.5 ml DAB → mit bidest auffüllen auf 100 ml

Die Membran wird in TTBS ca. 30 min vorinkubiert, mit einer 1:1000 Verdünnung des primären Antikörpers in TTBS über Nacht eingeschweift und auf dem Rüttler inkubiert. Die Membran wird entnommen und sorgfältig 3x 10 min in TTBS gewaschen. Ein Tropfen eines sekundären Antikörpers (Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert) wird mit 15 ml TTBS gemischt und die Membran damit für mindestens 2 h bei RT inkubiert. Man wäscht wiederum 3x 10 min mit TTBS und lässt anschließend die Membran mit einer Vectastain A+B-Lösung für 2 h reagieren. Die Vectastain A+B-Lösung enthält Avidin (A) und Biotin (B), letzteres ist an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Avidin ist ein Glycoprotein, dessen vier Untereinheiten sowohl mit dem Biotin des sekundären Antikörpers als auch mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Biotin reagieren können. Die Behandlung mit der A+B-Lösung soll die spätere Farbreaktion vervielfältigen. Nach erneutem Waschen mit TTBS wird die Membran in Entwickler-Lösung inkubiert. Hierbei reagiert die Meerrettich-Peroxidase mit DAB, das dem Entwickler zugesetzt wird, zu einer dunklen Farbe. Bei ausreichender Farbreaktion wird mit H₂O abgestoppt. Zur Definition des Hintergrundes wird mit Ponceau nachgefärbt.

2.11.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Immunhistochemische Untersuchungen an *Arabidopsis* Pflanzenschnitten wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Neumann (Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) durchgeführt. Die Pflanzen wurden dort zuerst 4 Wochen bei 23°C im Kurztag (8 h Licht) angezogen. Kleine Blattstücke wurden 2 h fixiert (4 % Formaldehyd, 5 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer pH 7.4), in Ethanol entwässert und in Lowicryl K4M eingebettet. Die Polymerisierung des Lowicryls erfolgte mit UV Licht bei -20°C. Ultradünnschnitte (50 – 70 nm) auf Ni-Grids wurden geblockt (0.5 % BSA, 0.1 % Gelatine, 0.5 % Tween) und mit primärem Antikörper (1:10) für 12h inkubiert (4°C). Mit Protein A/Gold 15nm wurde 1 h bei 25°C inkubiert, wobei Protein A direkt an den F_c-Teil der primären Antikörper binden kann. Die Schnitte werden

dann in 5 % wässrigem Uranylacetat kontrastiert. Für die Untersuchung diente ein Elektronen-Mikroskop LEO 912 OMEGA, die Aufnahmen erfolgten mittels einer 2K Slow Scan Kamera.

2.12 Sequenzanalysen *in silico*

2.12.1 Sequenzdatenbanken

Zur Suche nach pflanzlichen SSB-Homologen wurden folgende Datenbanken benutzt:

- MIPS <http://www.mips.biochem.mpg.de>
- EMBL <http://www.ebi.ac.uk>
- TIGR <http://www.tigr.org>
- ExPasy <http://us.expasy.org>

2.12.2 Algorithmen zur Vorhersage der Lokalisation

- TRANSPEP PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif.) version of TRANSPEP (Gavel und von Heijne, 1990)
- ChloroP 1.1 <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>
- Psort 6.4 <http://www.psort.org>
- TargetP 1.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>
- Predator <http://www.inra.fr/predator/>
- MitoProt II 1.0a4 <http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter> (Claros und Vincens, 1996)

3 Ergebnisse

Einzelstrang-DNA bindende Proteine sind ubiquitäre Proteine, die an der Replikation, Rekombination und Reparatur von DNA beteiligt sind. Eine Klasse dieser Proteine sind die mitochondriellen SSB-Proteine aus Eukaryoten. Sie sind kerncodiert und bilden, genau wie die bakteriellen SSBs, Homotetramere aus. SSB-Proteine aus Mitochondrien sind bisher aus den Vertebraten *Xenopus laevis* (Barat und Mignotte, 1981) und *Rattus norvegicus* (Hoke *et al.*, 1990), aus *Drosophila melanogaster* (Thommes *et al.*, 1995), aus dem Seeigel *Paracentrotus lividus* (Roberti *et al.*, 1997) sowie aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert worden (Van Dyck *et al.*, 1992). Die SSB-Proteine aus *Homo sapiens* (Curth *et al.*, 1994) und *Mus musculus* (Li und Williams, 1997) wurden als rekombinante Proteine exprimiert und untersucht. Der Nachweis eines pflanzlichen SSB-Proteins, welches sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten zu erwarten wäre, steht jedoch noch aus. Ein zu den bekannten mitochondriellen SSB-Proteinen homologes Protein aus Pflanzen zu identifizieren und zu charakterisieren, war Ziel dieser Arbeit.

3.1 SSB-Homologe in *Arabidopsis thaliana*

Die mitochondriellen SSBs (mtSSBs) weisen eine Homologie im Bereich der DNA-Bindungsdomäne auf (Abbildung 2). Es lag daher nahe, ein pflanzliches SSB über einen Sequenzvergleich mit einem bekannten mtSSB zu identifizieren. Daher wurde mit der Aminosäuresequenz des humanen mtSSB (*HsmtSSB*) eine Datenbankrecherche (2.12.1) über homologe Proteine in Pflanzen durchgeführt. Aus den Daten des *Munich Information Center for Protein Sequences* (MIPS) konnte mit dem Programm BLASTP 2.0 MP eine Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (At4g11060), die Homologien zum *HsmtSSB* aufwies. Zudem enthielt der Eintrag einen Vermerk über eine Ähnlichkeit zum Einzelstrang-DNA bindenden Protein aus *Vibrio cholerae*. Die Annotation gibt eine 765 Basenpaare umfassende Sequenz an, die für ein Protein mit einer Länge von 254 Aminosäuren codieren soll. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass das Gen 606 Basenpaare lang ist. Nachfolgend wird dieses Protein als *AthSSB-1* bezeichnet.

Ein weiteres putatives SSB aus *Arabidopsis thaliana* wird bei Tomaska *et al.* (2001) beschrieben. Die Autoren identifizierten neben dem oben erwähnten *AthSSB-1* ein zweites SSB aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.-Nr.: BAB02216 bzw. AP001303, EMBL nucleotide data bank). Das Protein konnte bei einem Datenvergleich auch in der MIPS-Datenbank gefunden

werden (AT3g18580). Es besteht aus 217 Aminosäuren und wird nachfolgend als *AthSSB-2* bezeichnet. Die Funktion des Proteins ist in der Datenbank nicht näher klassifiziert, eine Homologie zu *AthSSB-1* wird jedoch angezeigt. Aufgrund von *in silico* Sequenzanalysen schreiben Tomaska *et al.* (2001) *AthSSB-1* eine chloroplastidäre und *AthSSB-2* eine mitochondrielle Lokalisation zu. Eine Übersicht der wichtigsten Daten beider SSB-Proteine sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: *In silico* identifizierte SSB-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, identifiziert aufgrund von Sequenzvergleich mit *HsmtSSB*.

	<i>AthSSB-1</i>	<i>AthSSB-2</i>
MIPS Acc-Nr	AT4g11060	AT3g18580
EMBL Acc-Nr	AJ582222 ^a	AP001303, BAB02216
Basenpaare	606 ^{ab}	654 ^b
Molekulargewicht	22.2 ^a	24.2

a: nach Korrektur der Sequenz (vgl. 3.2 sowie Abbildung 11); b: inklusive Stopcodon

Ein Sequenzvergleich der gefundenen SSB-Proteine aus *Arabidopsis* mit *HsmtSSB* und *EcoSSB* veranschaulicht die Homologie unter den Proteinen (vgl. Abbildung 9). Besonders ausgeprägt ist diese im Bereich der DNA-Bindungsdomäne, die bei *EcoSSB* innerhalb der ersten 100 Aminosäuren lokalisiert ist (Williams *et al.*, 1983). Am N-Terminus tragen die mitochondriellen SSBs eine Importsequenz für den Transport ins Mitochondrium. Da die Importsequenzen pflanzlicher Proteine je nach Spezies und Protein von 13 bis hin zu 85 Aminosäuren reichen (Whelan und Glaser, 1997), könnte der deutlich längere N-terminale Bereich vor der Bindungsdomäne bei den *AthSSB*-Proteinen auf eine - im Vergleich zu *HsmtSSB* - längere Importsequenz hindeuten (Abbildung 9). Kruft *et al.* (2001) konnten bei einigen mitochondriellen Proteinen aus *Arabidopsis* den N-Terminus der reifen Proteine bestimmen, wodurch sie anhand der Sequenz der Vorläuferproteine die tatsächliche Länge der Importsequenzen abgeleitet haben. Die Importsequenz der untersuchten Proteine umfasste dabei durchschnittlich rund 41 Aminosäuren. Eine Bestimmung der Importsequenz für die *AthSSB*-Proteine mittels Vorhersagealgorithmen liefert Sequenzlängen zwischen 15 und 82 Aminosäuren (vgl. Tabelle 2). Die in dieser Arbeit angenommen Importsequenzlängen von 27 Aminosäuren für *AthSSB-1* und 22 Aminosäuren für *AthSSB-2* basieren auf der Vorhersage des Programms TRANSPEP (Gavel und von Heijne, 1990), da sie der von Kruft *et al.* (2001) ermittelten durchschnittlichen Länge am nächsten kommen.

Tabelle 2: Putative Längen der Importsequenzen von *AthSSB-1* und *AthSSB-2*, die mit den verwendeten Algorithmen vorhergesagt wurden. k.V.: keine Vorhersage.

	<i>AthSSB-1</i>	<i>AthSSB-2</i>	
TRANSPEP	27 AS	22 AS.	(Gavel und von Heijne, 1990)
MitoProt II 1.0a4	15 AS	20 AS	(Claros und Vincens, 1996)
TargetP V1.0	82 AS	k.V.	(Emanuelsson <i>et al.</i> , 2000)

HsmtSSB	<u>mfr</u> rpvlqvlrqfvrhe	settt	slvle	-----	27								
AthSSB-1	mnslairvskvlrssi	splai	saerg	skswfstgpiddegveedfe	envterpelqphgv	60							
AthSSB-2	masmatlrrlyrsll	snpri	sqasm	sfctnnitspedsdfdele	spiepkasdpsrf	60							
EcoSSB	mas	-----	-----	-----	-----	3							
HsmtSSB	-----	RSLNRVHLL	GRV	QD	PVLRQVEGKNP	V	TIFSLA	TNEMWRsgds	70				
AthSSB-1	dpr	kgwgf	-----	RGVHRAIIC	GKVGQA	PLQKILRNGRT	V	TIFTVG	TGGMFDqrlv	111			
AthSSB-2	sge	ervmeerplengld	SGI	FKAILVG	QVQQL	PLQKKLKSGRT	V	TLFSVG	TGGIRNnrrp	120			
EcoSSB	-----	RGVNK	VILVGNL	QD	PEVRYMPNGGAV	ANITLA	T	SESWRdkat	46				
HsmtSSB	evyqlgdvsqkt	---	T	WHRISVFRPG	LRD	VAYQYVKKGSRI	V	LEG	KIDYGEYMD	knnvrr	127		
AthSSB-1	gatn	qpkpa	-----	Q	WHRIAVHNEVL	GSYAVQKLAKNS	S	V	VEGDIETRVYND	sissev	165		
AthSSB-2	lined	preyasr	sav	Q	WHRVSVYPERL	ADLVLKNVEPGT	V	I	YLEGNLETKI	FTD	pvtglv	180	
EcoSSB	gem	keqt	-----	E	WHRVVLFG	KLAEVASEYLRKGS	Q	V	YIEG	QLRTRKWT	D	qsgqdr	97
HsmtSSB	qatti	iad	niifl	sdqtkeke	-----	-----	-----	-----	-----	148			
AthSSB-1	ksipe	icvrrdgkirmikygesiski	s	fdelkeg	li	-----	-----	-----	-----	201			
AthSSB-2	rrire	vairrngrvflgkagdmqpp	s	aelrgv	gyy	-----	-----	-----	-----	217			
EcoSSB	yttev	vvnvggtmqmlggrqgggapa	g	gnigggg	p	qggwgqppqppqggngfsggaqsrp	q	q	q	157			
HsmtSSB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	148			
AthSSB-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	201			
AthSSB-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	217			
EcoSSB	qsapa	apsneppmdfddipf	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	178			

Abbildung 9: Sequenzvergleich von EcoSSB und HsmtSSB mit den beiden pflanzlichen Homologen *AthSSB-1* und *AthSSB-2*. Das Alignment wurde mit dem Programm MACAW 2.0.5 erstellt (Schuler *et al.*, 1991). Die Importsequenz von HsmtSSB ist unterstrichen.

3.2 Amplifikation des *AthSSB-1* Gens

Als erstes sollte das *AthSSB-1* Gen mittels PCR amplifiziert werden, um eine Klonierung in Expressionsvektoren zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde von Frau Prof. Dr. Papenbrock (Universität Hannover, Institut für Botanik) freundlicherweise eine *Arabidopsis* cDNA Bank in λ YES Vektoren (Elledge *et al.*, 1991) zur Verfügung gestellt. Die Primer SSB-H und SSB-R (vgl. Abbildung 11) wurden von der annotierten Sequenz (AT4g11060) abgeleitet, wobei SSB-H am Beginn des Gens und SSB-R im Bereich des Stopcodons binden sollte. Aus

diesem PCR Ansatz ergab sich jedoch kein Produkt. Denkbare Gründe hierfür könnten das Fehlen des Gens in der cDNA Bank oder ein falsch annotierter Datenbankeintrag aufgrund fehlerhafter Vorhersage der Spleißstellen sein.

In einem weiteren PCR-Ansatz sollte daher zuerst die Anwesenheit des Gens in der cDNA Bank überprüft werden. Wie bereits beschrieben, sind die mitochondriellen SSB-Proteine homolog, wobei der Bereich der DNA-Bindungsdomäne um den Tryptophanrest 54 (bezogen auf *EcoSSB*; vgl. Abbildung 9) besonders konserviert ist. Basierend auf dem Datenbankeintrag AT4g11060 wurden Primer entworfen (SSB1 und SSB2; vgl. Abbildung 11), die im Bereich der DNA-Bindungsdomäne binden und den konservierten Bereich umfassen. Mit diesem Ansatz konnte aus der cDNA Bank ein PCR Produkt amplifiziert werden, das der erwarteten Länge von 255 BP entsprach (vgl. Abbildung 10). Da das Vorliegen des *AthSSB-1*-Gens in der cDNA Bank durch diesen PCR-Ansatz bestätigt werden konnte, war es sehr wahrscheinlich, dass das Fehlen eines PCR-Produktes im vorherigen Ansatz auf einer fehlerhaften Intron/Exon Zuordnung beruhte.

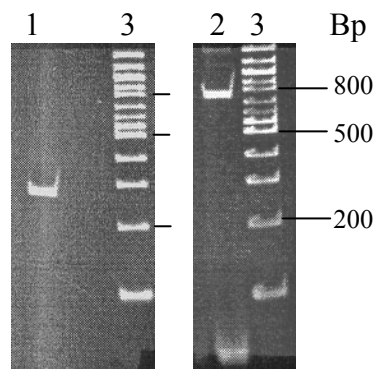


Abbildung 10: PCR Produkte aus Ansätzen mit *Arabidopsis* cDNA und unterschiedlichen Primerpaaren ($T_{\text{Annealing}}$: 56°C, 37 Zyklen); 5% PAGE in TPE-Laufpuffer; 1=Primer SSB1+2, 2=Primer SSB3+4, 3=100 Bp Standard (New England Biolabs).

Um nun das gesamte *AthSSB-1* Gen zu amplifizieren, wurden die Primer SSB3 und SSB4 auf der Grundlage der genomischen Sequenz abgeleitet, die in der MIPS Datenbank hinterlegt war (Zugang über AT4g11060). Die Erkennungssequenz von SSB3 beginnt am Startcodon. Der Rückprimer (SSB4) bindet außerhalb des codierenden Bereiches des *AthSSB-1*-Gens im Bereich der Polyadenylierungssite (AATAA) (vgl. Abbildung 11).

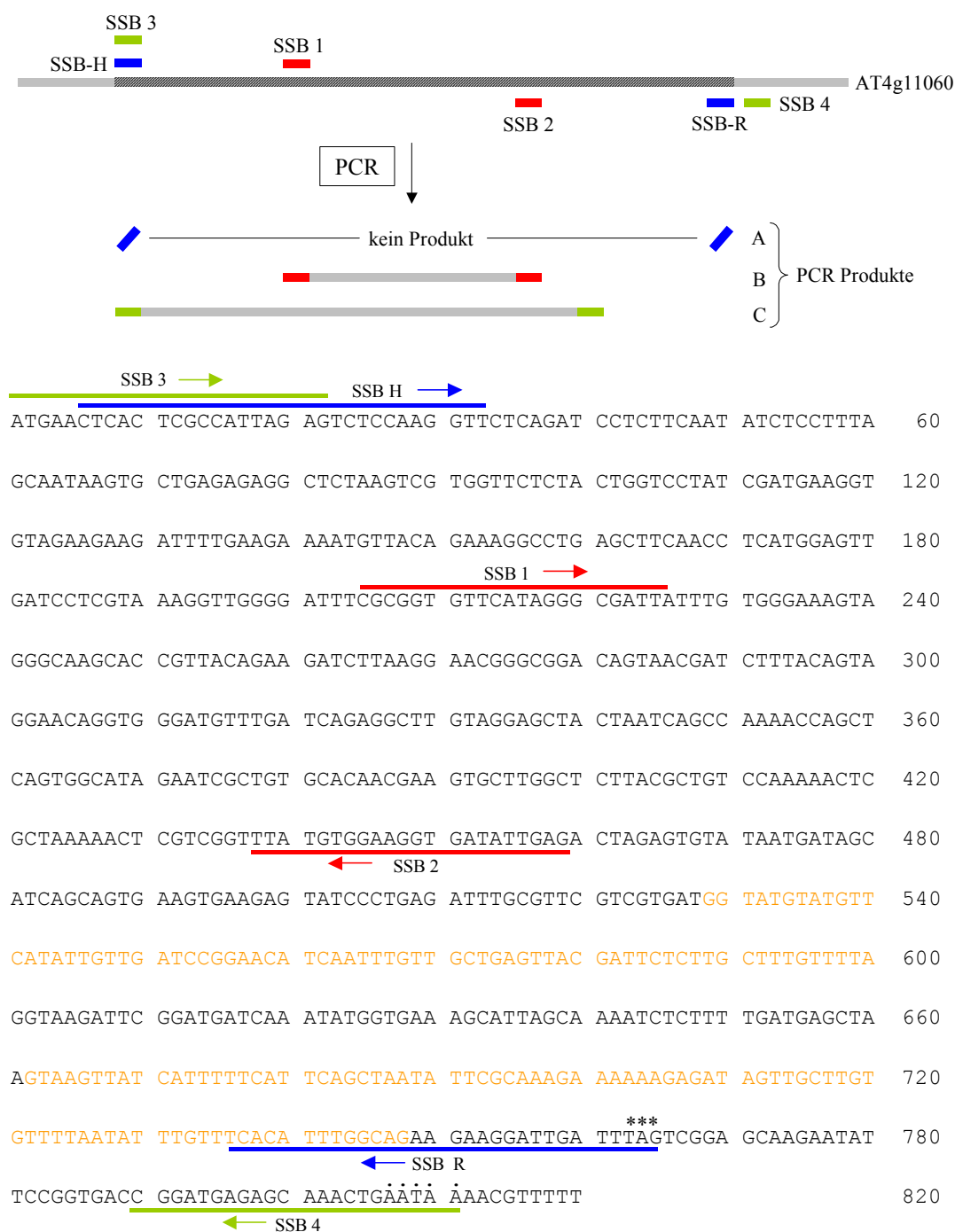


Abbildung 11: Annotierte DNA-Sequenz AT4g11060 aus Arabidopsis, auf deren Basis die eingesetzten Primer entworfen wurden. Die farbigen Balken stellen die Primer an ihrer vorgesehenen Bindungsstelle dar, wobei gleiche Farben jeweils ein Primerpaar repräsentieren. Oben: schematische Darstellung der PCR-Ergebnisse: schraffiert=annotierte DNA Sequenz AT4g11060; als Template diente eine cDNA Bank aus Arabidopsis. Nur mit Primerpaar B und C konnte je ein Produkt (255 bzw. 652 Bp) erhalten werden, die PCR unter Verwendung des Primerpaares A ergab hingegen kein Produkt. Unten: Die DNA-Sequenz wurde nach erfolgreicher PCR und Klonierung bestimmt. Schwarze Buchstaben geben die tatsächliche Sequenz wieder, orange-farbene Buchstaben fehlen in der cDNA. Die farbigen Striche markieren die Primerbindungsstellen. Das Stopcodon ist mit * gekennzeichnet. Punkte oberhalb der Sequenz markieren die Polyadenylierungsstelle.

Auf einem Polyacrylamidgel ließ sich die Größe des PCR-Produktes auf ca. 700–750 Basenpaare abschätzen (vgl. Abbildung 10). Das erhaltene Produkt war somit kleiner, als die erwarteten 811 Basenpaare.

Um die Sequenz des erhaltenen PCR Produktes zu überprüfen, wurde dieses in einen besonders zur Klonierung von PCR-Produkten geeigneten Vektor, pCR-Zero Blunt (Invitrogen) (2.5.3.1), ligiert. Dafür wurde der Vektor mit *StuI* linearisiert und mit dem PCR-Produkt zusammen ligiert, so dass das Konstrukt pCR-Blunt(*AthSSB-1*) resultierte. Die mit Hilfe von Plasmid-Midipräparationen (2.6.6) isolierte DNA wurde anschließend sequenziert (2.7.7). Es zeigte sich, dass zwei Abschnitte der annotierten Sequenz in der erhaltenen Sequenz fehlen (vgl. Abbildung 11, orangefarbene Markierung), wodurch der codierende Bereich des *AthSSB-1*-Gens nur 606 statt 765 Bp umfasst (inklusive Stopcodon). Die korrigierte Sequenz, die in dieser Arbeit ermittelt wurde, wurde mit einem Hinweis auf die Zugehörigkeit zur SSB-Familie in der EMBL-Datenbank hinterlegt (Acc.No. AJ582222). Die aus dem codierenden Bereich abgeleitete Proteinsequenz umfasst damit 201 Aminosäuren, nicht wie vorhergesagt 254 Aminosäuren.

Das Plasmid pCR-Blunt(*AthSSB-1*) diente im Verlauf der Arbeit als Template für weitere PCR-Ansätze. Abhängig davon, in welches Plasmid das Gen kloniert werden sollte, wurden die einzusetzenden Primer entworfen. Das resultierende PCR-Produkt trug dann die zur Klonierung benötigten Schnittstellen. Eine Zusammenstellung der Primer ist im Anhang dargestellt (5.3.1).

3.3 Expression von *AthSSB-1* in *E.coli*

Im Folgenden ist zuerst die erfolgreiche Expression von *AthSSB-1* in Fusion mit Glutathion-S-transferase dargestellt. Auf die Expressionsversuche eines nativen, nicht fusionierten Proteins, wird im Anschluss eingegangen.

3.3.1 Expression als Fusionsprotein mit pGEX-Konstrukten

Bei einer Expression von *AthSSB-1* als Fusionsprotein besteht die Möglichkeit, das Protein über Bindung an entsprechende Affinitätsäulen gezielt aufzureinigen. Bei dem gewählten GST Gene Fusion System (Amersham) tragen die pGEX-Vektoren ein C-terminales Fragment des *gst*-Gens aus *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988), welches für Glutathion-S-transferase codiert (26 kDa). Über die sich anschließende *multiple cloning site* (MCS) wird das gewünschte Gen carboxyterminal zum *gst*-Gen in den Vektor kloniert. Die

Erkennungssequenz einer Protease (Thrombin oder Precision Protease), die zwischen *gst*-Gen und MCS codiert ist, ermöglicht nach der Expression eine Abspaltung des gewünschten Proteins.

Für eine Charakterisierung von *AthSSB-1*, sollte dieses nach der Aufreinigung als reifes Protein vorliegen. Da das über PCR amplifizierte *AthSSB-1*-Gen für ein Vorläuferprotein mit einer hier angenommenen N-terminalen Importsequenz von 27 Aminosäuren codiert (vgl. 3.1), muss zur Klonierung und Expression ein entsprechend verkürztes *AthSSB-1*-Gen eingesetzt werden. Das sich daraus ergebene reife Protein besitzt damit eine Länge von 174 Aminosäuren.

Mit entsprechenden Primern wurde das verkürzte *AthSSB-1*-Gen amplifiziert und anschließend in die unten erwähnten pGEX-Vektoren kloniert. Bei der Expression resultiert dann ein Fusionsprotein von 45 kDa, das sich aus der 26 kDa GST-Domäne und dem verkürzten *AthSSB-1* mit einer Größe von 19 kDa zusammensetzt.

3.3.1.1 pGEX-2T(*AthSSB-1*) in *E.coli* LK111(λ)

Der eingesetzte Vektor pGEX-2T codiert nach dem *gst*-Gen für eine Thrombin-Schnittstelle (2.5.3.4). Über *EcoRI* und *BamHI* wurde das um die putative Importsequenz verkürzte *AthSSB-1* Gen in den Vektor kloniert, woraus das Konstrukt pGEX-2T(*AthSSB-1*) resultierte. Der Vektor wurde anschließend in LK111(λ) (2.5.2.1) transformiert und die aus Plasmidpräparationen (2.6.6) erhaltene DNA sequenziert. Die erfolgreiche Klonierung konnte damit bestätigt werden. Nach Induktion der Proteinexpression (2.8.3) und anschließender SDS-PAGE der abgenommenen Proben (2.8.1) zeigte sich eine schwache Expressionsbande bei 45 kDa. Durch Zellaufschluss mit anschließender Affinitätsreinigung über Glutathion Sepharose 4B (2.9.2) konnte dieses Protein jedoch nicht angereichert werden.

Auch im Western Blot konnte mit einem gegen GST gerichteten Antikörper kein Nachweis eines GST-Fusionsproteins erbracht werden. Zur Kontrolle wurde der leere pGEX-2T Vektor, in LK111(λ) transformiert und unter den gleichen Bedingungen exprimiert. Hier konnte anhand des GST-Antikörpers eine Expressionszunahme der Glutathion-S-transferase bei ca. 26 kDa detektiert werden (nicht gezeigt). Das Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei der Expression bei 45 kDa nicht um ein GST-Fusionsprotein handelt.

3.3.1.2 pGEX-2T(*AthSSB-1*) in *E.coli* SG13009

Der vorherige Expressionsversuch in LK111(λ), sowie die erhaltenen Ergebnisse der Expressionsversuche eines nativen Proteins, die in Kapitel 3.3.2 dargestellt sind, lassen

vermuten, dass *AthSSB-1* in *E.coli* Zellen abgebaut wird. Das würde erklären, warum eine Überexpression des Proteins in vorherigen Expressionstest dieser Arbeit nicht detektiert werden konnte.

Die Expression eukaryotischer Proteine, die in *E.coli* abgebaut werden, kann möglicherweise in einem lon negativen Stamm begünstigt werden. Ein solcher Stamm ist defizient für die La-Protease, deren Aufgabe im Abbau von für *E.coli* anomalen oder falsch gefalteten Proteinen besteht (Goldberg, 1992). Das Konstrukt pGEX-2T(*AthSSB-1*) wurde daher in den lon negativen *E.coli*-Stamm SG13009 (2.5.2.5) transformiert. Bei Induktion mit 1 mM IPTG zeigte sich nach 3 h eine deutliche Zunahme einer Bande bei 45 kDa (vgl. Abbildung 12).

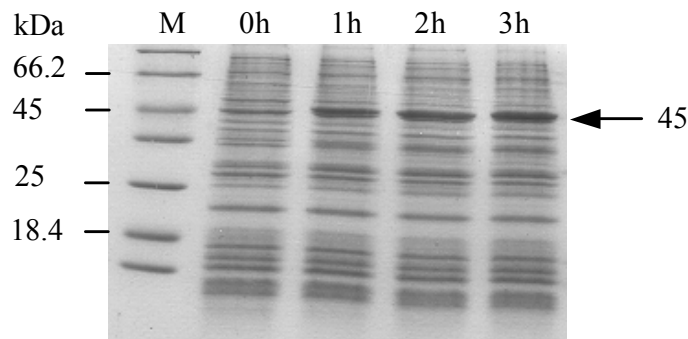


Abbildung 12: Expression des Fusionsproteins GST-*AthSSB-1* in *E.coli* SG 13009. Wachstum der Zellen bei 37°C in LB-Medium, Induktion mit 1mM IPTG. Probenentnahme vor Induktion (0h) und jeweils 1h, 2h und 3h nach Induktion. Der Pfeil kennzeichnet die Expressionsbande des Fusionsproteins; 15 % SDS-PAGE nach Laemmli (1970).

Wie unter 2.9.1 beschrieben, wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen, das Fusionsprotein an Glutathion Sepharose gebunden (2.9.2) und das Säulenmaterial gewaschen. Nach Elution mit 10 mM Glutathion wurde durch Zugabe von Thrombin die 26 kDa GST-Domäne vom Fusionsprotein abgespalten (2.9.3). Um den Erfolg der Spaltung zu überprüfen, wurden während der Spaltung zu verschiedenen Zeitpunkten Proben des Ansatzes abgenommen und elektrophoretisch aufgetrennt. Erwartungsgemäß zeigte sich eine Abnahme des Fusionsproteins unter gleichzeitiger Zunahme der 26 kDa GST-Domäne und dem 19 kDa *AthSSB-1* (vgl. Abbildung 13). Ungünstigerweise war aber bereits nach weniger als 10 min eine zusätzliche Bande bei ca. 15 kDa zu beobachten. Wie sich aus dem 24 h Wert erkennen lässt, resultiert diese offensichtlich durch Abbau des gewünschten *AthSSB-1* Proteins (vgl. Abbildung 13, 24 h). Mittels Westernblot (2.11.3) konnte ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um ein Abbauprodukt von GST handelt. Sowohl GST-*AthSSB-1* als auch GST wurden durch einen Anti-GST-Antikörper detektiert, nicht jedoch die Abbaubande. Über präparative Ansätze der Thrombinspaltung wurde Protein gewonnen, das zur Herstellung von

AthSSB-1 Antikörpern eingesetzt werden konnte. Dafür wurde die Spaltung nach 15 min mit Auftragspuffer abgestoppt, nach elektrophoretischer Auftrennung die entsprechende Bande bei 19 kDa ausgeschnitten und die Gelstücke zur Immunisierung eingesetzt (vgl. 3.7.1).

Da das Protein durch Thrombin abgebaut wurde und nur über ein denaturierendes Gel isoliert werden konnte, war diese Aufreinigungsmethode von *AthSSB-1* für dessen spätere Charakterisierung nicht geeignet.

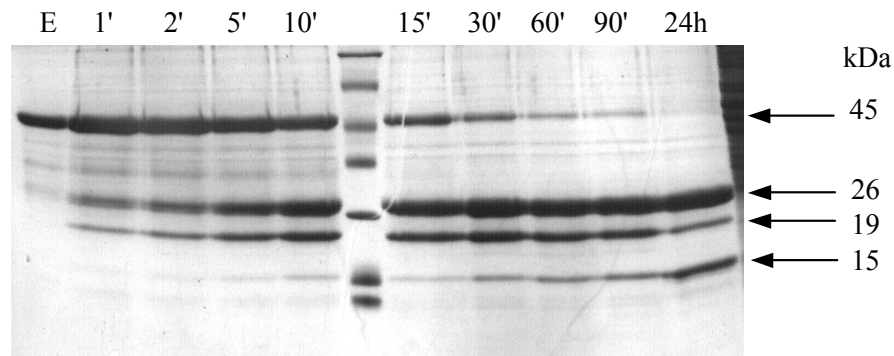


Abbildung 13: Zeitwerte der Thrombinspaltung des GST-*AthSSB-1*-Fusionsproteins. E= GST-*AthSSB-1* nach Elution von der Glutathion Sepharose Säule; 15% SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Die Kinetik zeigt eine Abnahme des Fusionsproteins (45 kDa) bei gleichzeitiger Zunahme von GST (26 kDa) und *AthSSB-1* (19 kDa). Nach ca. 10 min bildet sich eine Abbaubande von ca. 15 kDa.

3.3.1.3 pGEX-6P(*AthSSB-1*) in *E.coli* SG 13009

Ein etwas modifizierter Ansatz ergibt sich bei der Verwendung eines pGEX-6P Vektors. Zur Spaltung des Fusionsproteins kann hierbei eine an GST fusionierte PreScission Protease eingesetzt werden, da bei dem von pGEX-2T abgeleiteten Vektor die Thrombinschnittstelle durch eine Schnittstelle der PreScission Protease ersetzt ist (2.5.3.4). Die Protease ist dadurch in der Lage, genau wie das Fusionsprotein an die Affinitätssäule zu binden. Das abgespaltene Protein lässt sich dann mit Puffer von der Säule eluieren, während die Protease am Säulenmaterial gebunden bleibt.

Die Klonierung von *AthSSB-1* in pGEX-6P erfolgte ebenfalls über *EcoRI* und *BamHI* mit anschließender Transformation in den *E.coli* Stamm SG13009 (2.5.2.5). Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA bestätigt. Die Expression des Konstrukts pGEX-6P(*AthSSB-1*) wurde mit 0.3 mM IPTG induziert und wie zuvor Proben vor und nach der Induktion entnommen. Die anschließende Analyse über SDS-PAGE zeigte bei der drei Stunden nach Induktion entnommenen Probe eine Expression

vergleichbar mit der, die mit dem Plasmid pGEX-2T(*AthSSB-1*) erreicht wurde (vgl. Abbildung 14). Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen (2.9.1) und das 45 kDa Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose gebunden (2.9.2). Die Spaltung erfolgte mittels PreScission Protease auf der Säule (2.9.3). Das 19 kDa *AthSSB-1* ließ sich anschließend fraktionsweise mit Spaltpuffer von der Säule waschen (vgl. Abbildung 14).

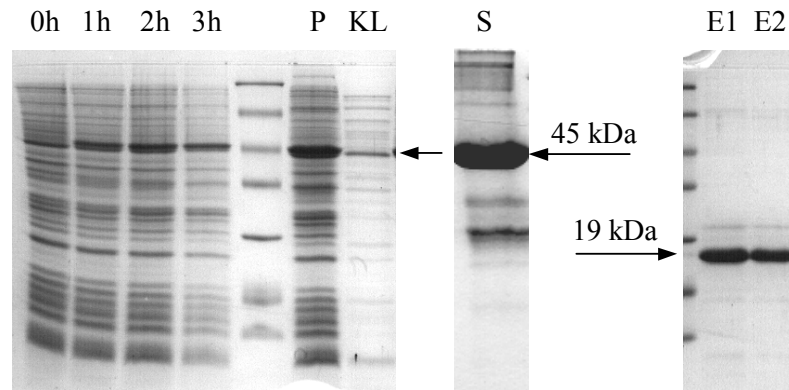


Abbildung 14: Expression und Aufreinigung von *AthSSB-1*. Zellen vor Induktion (0h) und jeweils 1h, 2h, 3h nach Induktion mit 0.3 mM IPTG; P= Pellet nach Zellaufschluss, KL= Überstand nach Zellaufschluss, S= Glutathion Sepharose 4B nach Auftrag des KL, E1,E2= Eluate nach Spaltung mit PreScission Protease; 15 % SDS-PAGE nach Laemmli (1970).

Das Absorptionsspektrum des aufgereinigten Proteins zeigte jedoch ein Maximum bei 260 nm, was auf eine Verunreinigung mit Nukleinsäure schließen ließ (vgl. Abbildung 15). Der Auftrag der Probe auf ein Agarose-Gel mit anschließender Ethidiumbromid Färbung ließ eine prominente Bande erkennen, die in einem parallelen Ansatz nach Zugabe von RNase nicht mehr nachweisbar war (nicht gezeigt). Dies ließ den Schluss zu, dass es sich bei den Verunreinigungen um RNA handelte. Da *HsmtSSB* erfolgreich über Blue Sepharose aufgereinigt werden kann (Curth *et al.*, 1994), lag es nahe, diese Affinitätsbindung zur Trennung von RNA und *AthSSB-1* einzusetzen. Tatsächlich konnte durch Bindung des Proteins an Blue Sepharose und anschließendes Waschen die RNA abgetrennt werden (2.9.4). Das Protein wurde durch 4 M Harnstoff von der Säule eluiert und gegen einen harnstofffreien Puffer (0.3 M NaCl, 20 mM KP_i) dialysiert. Eine Kontrolle des Absorptionsspektrums bestätigte die gewünschte Reinigung (vgl. Abbildung 15). Bei dieser Aufreinigungsmethode ist jedoch zu beachten, dass das Protein durch den Elutionsschritt mit Harnstoff zwischenzeitlich denaturierenden Bedingungen ausgesetzt ist.

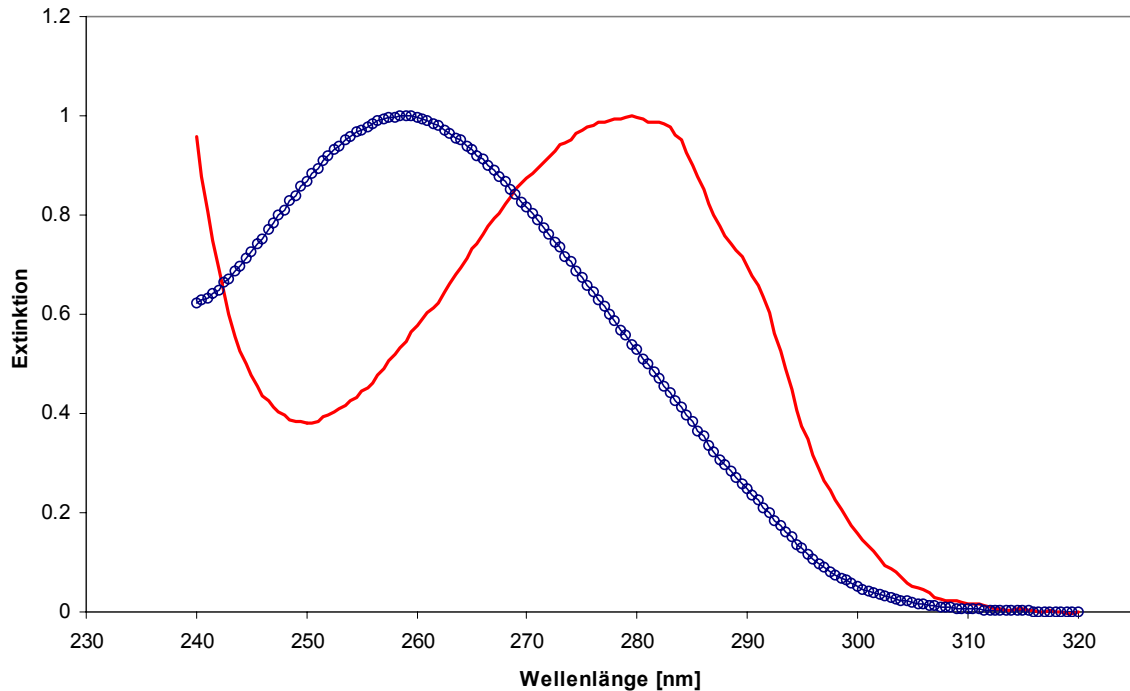


Abbildung 15: Vergleich der Absorptionsspektren von verschiedenen *AthSSB-1* Präparationen. Blau (○) = nach Spaltung mit PreScission Protease und anschließender Elution mit Spaltpuffer, Rot= (-) wie zuvor, mit zusätzlicher Affinitätsreinigung über Blue Sepharose. Zum besseren Vergleich wurden die Spektren normiert.

Alternativ wurden daher die mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen mit 0.7 mg RNase pro Milliliter Zellsuspension versetzt und das Protein anschließend wie beschrieben (2.9.2) über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Mit dieser Methode liegt das *AthSSB-1* ohne denaturierende Schritte bereits nach der Affinitätsreinigung über Glutathion-Sepharose RNA-frei vor und kann nach Dialyse (2.9.5) für Experimente eingesetzt werden. Die nachfolgenden Aufreinigungen des Proteins wurden daher nach dieser Methode durchgeführt. Aus einer 10 l Fermentation (2.8.2) lassen sich so ca. 1-12 mg *AthSSB-1* gewinnen, dessen Reinheit mittels SDS-PAGE auf mehr als 95 % abgeschätzt werden kann (vgl. auch Abbildung 14).

3.3.2 Expression mit pSF und pET-Konstrukten

Neben den oben beschriebenen Expressionen als Fusionsprotein wurden Versuche durchgeführt, bei denen *AthSSB-1* als unverändertes (nicht fusioniertes) Protein exprimiert werden sollte. Die eingesetzten PCR-Produkte codierten dabei – anders als bei den Fusionsproteinen – jeweils für das Vorläuferprotein.

3.3.2.1 pSF(*AthSSB-1*) in TGE 900

Der Vektor pSF1 (Bayer *et al.*, 1989) wurde gewählt, da hiermit bereits das humane, mitochondrielle SSB (*HsmtSSB*) erfolgreich kloniert und anschließend in *E.coli* exprimiert werden konnte (Curth *et al.*, 1994). pSF1 enthält das *EcoSSB*-Gen, welches vor der Klonierung mit *EcoRI* herausgespalten wurde. Nach Auftrennung des Spaltansatzes (2.7.2) wurde das Rahmenfragment isoliert (2.7.4) und dephosphoryliert (2.7.5). Das *AthSSB-1* Gen wurde mittels PCR (2.6.1) mit *EcoRI*-Schnittstellen amplifiziert und über *EcoRI* in den Vektor kloniert, wo es der Kontrolle des λ -P_L-Promotors unterliegt. Nach Transformation in LK111(λ) und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA konnte durch Sequenzierung die korrekte Sequenz des eingeführten *AthSSB-1* Gens bestätigt werden. Das erhaltene pSF(*AthSSB-1*)-Konstrukt wurde zur Expression in den *E.coli* Stamm TGE900 (2.5.2.2) transformiert. Der Stamm codiert für den temperatursensitiven λ -cI857 Repressor, welcher ab einer Temperatur von 40°C inaktiviert wird. Die Induktion erfolgte daher durch eine Temperaturshift von 30°C auf 42°C (vgl. 2.8.3). Proben vor und 3 h nach Induktion wurden über SDS-PAGE und Coomassie Färbung verglichen. Auf der erwarteten Höhe von 22 kDa war jedoch keine Expressionsbande zu sehen (nicht gezeigt). Versuche, *AthSSB-1* aus den Zellextrakten – in Anlehnung an die Aufreinigung des *HsmtSSBs* (Curth *et al.*, 1994) – über Blue Sepharose aufzureinigen gelangen nicht. Auch zwei zu diesem Zeitpunkt der Arbeit verfügbaren, gegen synthetische Peptide (abgeleitet aus der *AthSSB-1* Sequenz) (vgl. 2.3) gerichtete Antikörper erbrachten im Westernblot keinen Nachweis von *AthSSB-1*. Aufgrund der Ergebnisse war ein Abbau des Proteins in den *E.coli* Zellen sehr wahrscheinlich.

3.3.2.2 pET-15b(*AthSSB-1*) in BL21(DE3)pLysS

Um eine Grundexpression, die während der Wachstumsphase vor Induktion auftreten kann, möglichst gering zu halten und damit einem vorzeitigen Abbau des Proteins vorzubeugen, wurde *AthSSB-1* in pET-15b (Novagen) (2.5.3.3) kloniert, wo das Gen dem Promotor des Bakteriophagen T7 unterliegt, so dass nur in *E.coli* Stämmen, die für die T7-RNA-Polymerase codieren, eine Expression möglich ist.

pET-15b wurde mit *XhoI/NcoI* gespalten und die Enden dephosphoryliert. Das Insert wurde wie beim pSF-Konstrukt über PCR aus der Plasmid-DNA pCR-Blunt(*AthSSB-1*) amplifiziert anschließend in pET-15b ligiert (2.7.6). Zur Vermehrung wurde der Vektor in LK111(λ) transformiert und die aus Plasmidpräparationen erhaltene DNA sequenziert. Die korrekte Sequenz der DNA konnte bestätigt werden. Anschließend wurde pET-15b(*AthSSB-1*) in BL21(DE3)pLysS Zellen transformiert, die das für die Expression notwendige Gen der T7-RNA-Poymerase (DE3) tragen. Zudem ist der Stamm lon negativ (vgl. 2.5.2.3), so dass die

Expression dadurch hätte begünstigt werden können. Nach Induktion mit 1 mM IPTG konnte in Expressionstests aber keine Expressionszunahme bei 22 kDa erreicht werden (nicht gezeigt). Der Versuch, *AthSSB-1* in Rosetta (DE3) pLysS (vgl. 2.5.2.4 und 3.4) zu exprimieren, blieb ebenfalls ohne Erfolg.

Die insgesamt unbefriedigenden Ergebnisse der Versuche, *AthSSB-1* als unverändertes Protein zu exprimieren, führten zur Wahl der unter 3.3.1 beschriebenen Expression als Fusionsprotein, so dass ausgehend davon eine Aufreinigungsmethode für *AthSSB-1* (vgl. 3.3.1.3) aufgestellt werden konnte.

3.4 Klonierung und Expression von *AthSSB-2*

Das für *AthSSB-2* gefundene Gen (MIPS: AT3g18580) sollte ebenfalls aus der cDNA von *Arabidopsis* amplifiziert werden. Aufgrund der Erfahrungen bei der Amplifikation von *AthSSB-1* (siehe 3.2), wurde der Rückprimer (SSB2-R) gleich außerhalb des codierenden Bereiches gewählt, der Hinprimer SSB2-H bindet am Anfang des Gens, beginnend am Startcodon. Die Primer trugen am 5'-Ende zusätzlich eine Schnittstelle, der Hinprimer eine *NcoI*-site, der Rückprimer eine *XhoI*-site. Als Template für die PCR diente die λ cDNA Bank. Mit einer Zyklen Zahl von 40 und einer Annealing-Temperatur zwischen 50°C und 55°C konnten PCR-Produkte in der erwarteten Länge von 749 Basenpaaren amplifiziert werden (vgl. Abbildung 16).

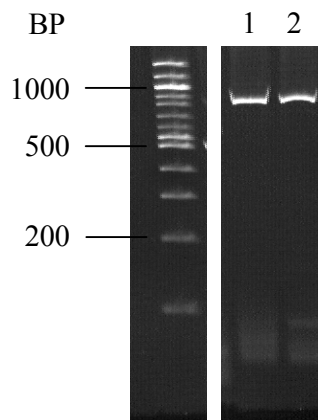


Abbildung 16: Amplifikation von *AthSSB-2*. PCR mit unterschiedlichen Ansätzen: 40 Zyklen, $T_{\text{Annealing}} = 50.9^{\circ}\text{C}$ (1) bzw. 53.4°C (2). Primer: SSB2-H + SSB2-R; Template: *Arabidopsis* cDNA. Gel: 5% PAGE in TPE Laufpuffer; Standard: 100 bp-DNA ladder (New England Biolabs)

Die Klonierung erfolgte nach Spaltung des PCR-Produktes mit *NcoI/XhoI* in den Vektor pET-15b (2.5.3.3), der vorher ebenfalls mit *NcoI* und *XhoI* gespalten wurde. Das Konstrukt

pET-15b(*AthSSB-2*) wurde zur Vermehrung des Plasmids in LK111(λ) transformiert. Die Sequenzierung der aus Plasmid-Minipräparationen (2.6.5) erhaltenen DNA ergab, dass die erhaltene Sequenz mit der annotierten Sequenz übereinstimmte. Die Plasmid-DNA wurde bei nachfolgenden PCR-Ansätzen als Template eingesetzt.

Da bei *AthSSB-1* die Expression als Fusionsprotein erfolgreich war, sollte *AthSSB-2* ebenfalls an GST fusioniert exprimiert werden. Die Verwendung des pGEX 6P-Vektors (2.5.3.4) führte in diesem Fall jedoch zu keiner Expression eines Proteins von ca. 47 kDa. Daher wurde ein von pET-15b abgeleiteter Vektor, pETGEX-6P, konstruiert (vgl. 2.5.3.5), bei dem das *gst*-Gen der Kontrolle des *T7lac* Promoters unterliegt.

Die Klonierung des verkürzten *AthSSB-2* Gens erfolgte über *Bam*HI und *Xho*I, wodurch der Vektor pETGEX-6P(*AthSSB-2*) resultierte. Aufgrund des vorhandenen *T7lac* Promotors wurde das Plasmid in den Stamm BL21(DE3)pLysS (2.5.2.3) transformiert, der für die erforderliche T7-RNA-Polymerase codiert. Die Expression wurde mit Zugabe von 0.3 mM IPTG gestartet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der vor Induktion und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion entnommenen Proben zeigte eine Zunahme auf Höhe von 47 kDa, die der erwarteten Größe des Fusionsproteins entsprach.

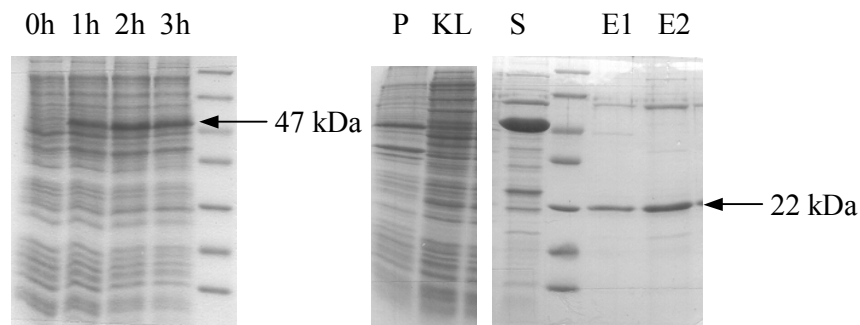


Abbildung 17: Expression und Aufreinigung von *AthSSB-2*. BL21(DE3)pLysS *E.coli* Zellen mit pETGEX-6P(*AthSSB-2*) angezogen bei 37°C, Zellen vor (0h) und 1h, 2h bzw. 3h nach Induktion mit 0.3 mM IPTG. P = Pellet nach Zellaufschluss, KL = Überstand nach Zellaufschluss, S = Glutation Sepharose 4B nach Auftrag von KL und anschließendem Waschen, E1, E2 = Eluate nach Spaltung mit PreScission Protease; 15 % SDS-PAGE nach Laemmli (1970).

Die Menge des überexprimierten Proteins im Verhältnis zum Gesamtprotein war dabei abhängig vom Volumen der Zellkultur und von der Wachstumsdauer der Vorkultur. Während die Expression von GST-*AthSSB-2* in 0.5 l LB-Medium deutlich zunahm (vgl. Abbildung 17), konnte im 10 l Maßstab kaum eine Expressionszunahme festgestellt werden (nicht gezeigt). Des Weiteren wirkt sich die Anzucht der Vorkultur über einen Zeitraum von mehr

als 24 h negativ auf die Überexpression aus, was auf einen proteolytischen Abbau hindeutete. Die Zellen der Vorkultur wurden daher einmal über Nacht (ca. 16 h) angezogen, die Expression am Folgetag in mehreren 0.5 l Kulturen durchgeführt und die geernteten Zellen im Nachhinein vereinigt.

Die Aufreinigung von *AthSSB-2* erfolgte wie unter 2.9.2 beschrieben über Glutathion Sepharose mit anschließender Spaltung mit PreScission Protease (2.9.3). Um das Protein zur Immunisierung einsetzen zu können, wurden die Eluate über ein präparatives Gel aufgetrennt und die gewünschte Bande bei ca. 22 kDa ausgeschnitten.

Eine weitere Expression von *AthSSB-2* wurde als unverändertes Protein getestet, wofür das *AthSSB-2*-Gen über *XhoI/BamHI* in den pET-15b kloniert wurde. Die Expression selbst erfolgte im *E.coli* Stamm Rosetta(DE3) pLysS (2.5.2.4), einem Stamm, der über in *E.coli* selten vorkommende tRNAs verfügt und damit eine heterologe Expression begünstigen könnte. Nach Induktion mit 1 mM IPTG (2.8.3) zeigte sich eine deutliche Expressionszunahme auf Höhe von ca. 26 kDa (nicht gezeigt). Nach Zellaufschluss befanden sich jedoch >95% des Proteins im Pellet, vermutlich als *inclusion bodies*. Eine Solubilisierung des Proteins konnte mit 3 M Guanidiniumchlorid erreicht werden. Die Entfernung des Guanidiniumchlorids durch anschließende Dialyse hatte jedoch die Präzipitation des Proteins zur Folge. *AthSSB-2* wurde daher nur für die Immunisierung eingesetzt.

Von beiden *AthSSB*-Proteinen konnte nur *AthSSB-1* in einer befriedigenden Menge und Reinheit hergestellt werden, die Charakterisierung in bezug auf die Eigenschaften des Proteins erfolgte deshalb nur mit *AthSSB-1*.

3.5 Untersuchungen zur Oligomerisierung von *AthSSB-1*

Die bisher untersuchten mitochondrialen SSB-Proteine liegen als Homotetramere vor (für eine Übersicht vgl. Tomaska *et al.*, 2001). *AthSSB-1* wurde aufgrund seiner Homologien zu mitochondrialen und bakteriellen SSBs den homotetrameren SSB-Proteinen zugeordnet. Für das pflanzliche SSB sollte daher auch eine homotetramere Struktur zu erwarten sein.

3.5.1 Quervernetzungsexperiment (Crosslink)

Eine relativ schnelle Methode, um Hinweise auf den Oligomerisierungszustand eines Proteins zu erhalten, ist die kovalente Quervernetzung der Untereinheiten. Durch das Quervernetzungsreagenz Dimethylsuberimidat (DMS) werden freie Aminogruppen, die in

räumlicher Nähe zueinander liegen, kovalent miteinander verbunden (Davies und Stark, 1970). Liegen die Aminogruppen auf verschiedenen Untereinheiten, so lässt sich die Verknüpfung der Untereinheiten auf einem denaturierenden Gel durch das Auftreten einer „Protein-Leiter“ erkennen, die sich aus den Molmassen der Oligomere zusammensetzt. Wird der Crosslink beispielsweise mit *EcoSSB* durchgeführt, so treten durch die Verknüpfung der Untereinheiten vier Banden auf, die den Molekulargewichten von Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer entsprechen (Genschel, 1995).

AthSSB-1 wurde in An- und Abwesenheit des Quervernetzers DMS für 3 h inkubiert (vgl. 2.10.3). Parallel dazu wurde ein Kontrollansatz mit *EcoSSB* durchgeführt. Nach TCA-Fällung wurden die Proben über eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 18).

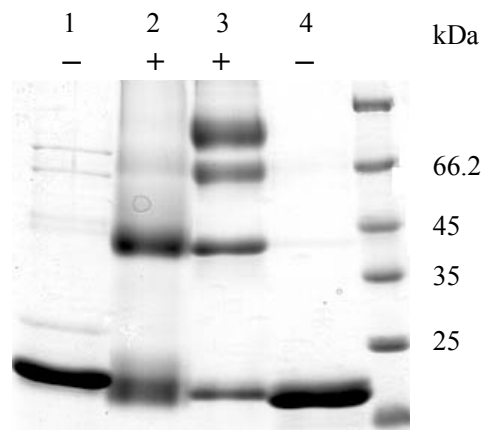


Abbildung 18: Crosslink von *AthSSB-1* (1,2) und *EcoSSB* (3,4) in Gegenwart (+) und Abwesenheit (-) von DMS. 12 % SDS-PAGE Laemmli (1970).

EcoSSB zeigte auf dem denaturierenden Gel die vier Banden der entsprechenden Oligomere. Im Ansatz mit *AthSSB-1* sind nach der Quervernetzung überwiegend zwei Banden zu erkennen, deren Molekulargewichte von 19 kDa bzw. 38 kDa mit den Größen korrespondieren, die für Monomer und Dimer zu erwarten wären. Es lässt sich nur der minimale Oligomerisierungszustand ableiten. Auf eine mögliche prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Oligomere in der Lösung lässt sich aber nicht schließen. Im Fall von *EcoSSB* sind auf dem Gel vier Banden der unterschiedlich verknüpften Protomere zu sehen, in Lösung liegt das Protein ausschließlich als Tetramer vor. Die Crosslink-Experimente deuten darauf hin, dass *AthSSB-1* in der Lage ist, Oligomere zu bilden und mindestens als Dimer vorliegen. Einen Hinweis, ob *AthSSB-1* höchstens als Dimer vorliegt oder ob es auch als Tetramer vorliegen kann, gibt dieses Experiment nicht.

3.5.2 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation (UZ) ist eine weitere Methode, mit der Aussagen über den Oligomerisierungszustand gewonnen werden können. Mit Hilfe der Sedimentation-Diffusion-Gleichgewichtszentrifugation lässt sich die Molmasse eines Makromoleküls bestimmen. Hierbei wird unter Verwendung von mittleren Drehzahlen so lange zentrifugiert, bis sich in der Lösung ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion eingestellt hat. Mit Kenntnis des theoretischen Molekulargewichtes des Monomers ergibt sich daraus der Oligomerisierungszustand des Proteins. Die Sedimentationsgeschwindigkeits-Analyse kann zusätzlich Aufschluss über die Form (Perrin-Faktor) eines Proteins geben.

AthSSB-1 wurde in UZ-Gleichgewichtsläufen bei 20°C mit 23.000 rpm zentrifugiert (Puffer: 75 mM NaCl, 20 mM KP_i , pH 7.4). Die orts aufgelöste Absorptionsmessung erfolgte bei 230 nm. Die Messungen wurden mit Hilfe des Programms BPCFit (Kindler, 1997) akkumuliert und ausgewertet (2.10.4). Hierbei wird eine theoretische Kurve durch ein vorgegebenes Modell iterativ den Messdaten angepasst. Die Auswertung wurde unter Annahme verschiedener Modelle durchgeführt, deren theoretische Kurven (dünne Linien) in Abbildung 19 zusammen mit den Messdaten (dicke Linie) dargestellt sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass je nach Modell die Kurven zum Teil deutlich von den Messdaten abweichen. Unter der Annahme, dass in der Lösung nur eine Spezies (eine Molmasse) vorliegt (Kurve 1), ergibt die Auswertung für *AthSSB-1* ein Molekulargewicht von ca. 32 kg/mol. Da das Monomer eine theoretische Molmasse von 19.4 kg/mol besitzt, lässt sich dieses Ergebnis am ehesten mit dem Vorliegen eines Dimers erklären. Dass die Anpassung mit einer Spezies nicht optimal gelingt, lässt auf eine gewisse Heterogenität der Probe schließen. In der Lösung liegen (mindestens) zwei Spezies mit unterschiedlichen Molekulargewichten vor. Daher wurde angenommen, dass das monomere Protein (19.4 kg/mol) dimerisieren kann ($n\text{-mer}=2$) (2.10.4). Dieses Dimerisierungsmodell beschreibt die Konzentrationsverteilung in der Zelle tatsächlich am besten. Die Gleichgewichtskonstante von Monomer und Dimer ergibt sich hierbei zu $K_{\text{ass}}=3.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Weitere Auswertungen, bei denen die Molmassen eines Dimers (Kurve 2), Tetramers (Kurve 3) oder eines Gemisches aus Monomer und Tetramer (Kurve 4) als bekannt vorgegeben wurden, konnten den Konzentrationsverlauf nicht hinreichend beschreiben.

Die Ergebnisse der UZ-Gleichgewichtsläufe lassen sich daher insgesamt am besten durch das Vorliegen eines Gleichgewichts aus Monomer und Dimer in der *AthSSB-1* Lösung beschreiben.

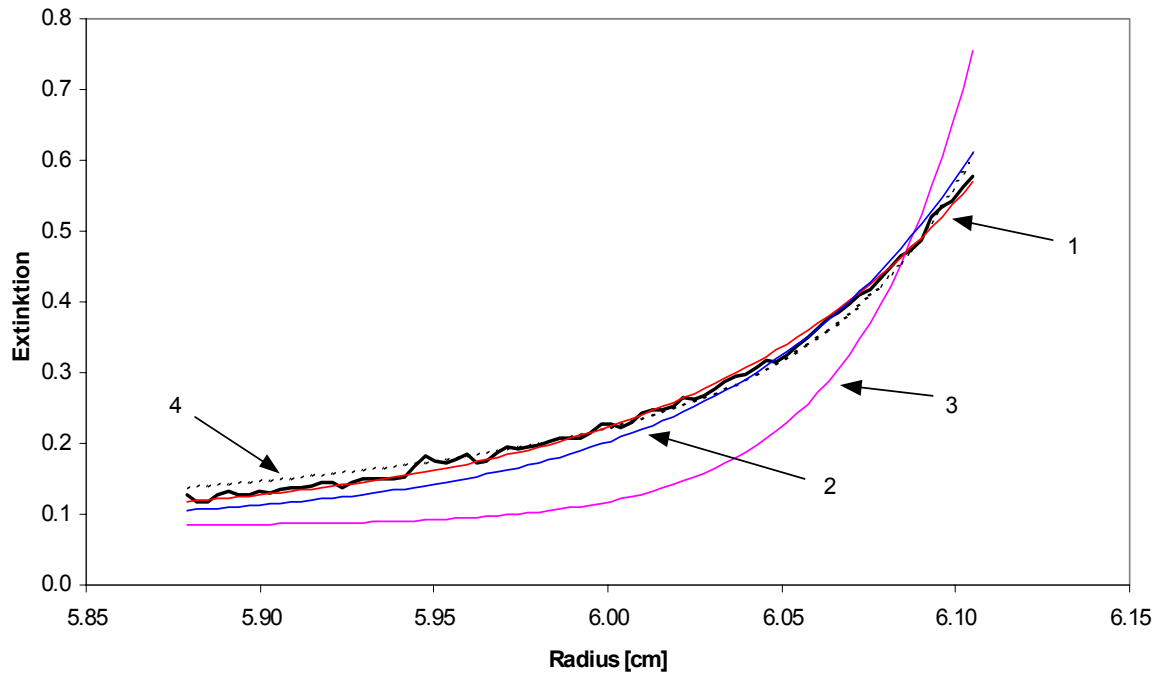


Abbildung 19: UZ-Gleichgewichtslauf mit $9 \mu\text{M}$ AthSSB-1 in 75 mM NaCl, 20 mM Kpi, pH 7.4, 230 nm , 20°C , 23.000 rpm . Konzentrationsverlauf in der Zelle, dargestellt durch die akkumulierten Messdaten (dicke Linie). Auswertung mit BPCFit unter folgenden Annahmen: **1)** rot: die Lösung enthält eine Spezies mit $M_1 = \text{ca. } 32 \text{ kg/mol}$; **2)** blau: die Lösung enthält nur Dimer ($M_1 = 38.872 \text{ kg/mol}$); **3)** pink: die Lösung enthält nur Tetramer ($M_1 = 77.744 \text{ kg/mol}$); **4)** gestrichelt: die Lösung enthält Mono- und Tetramer ($M_1 = 19.436 \text{ kg/mol}$, $M_2 = 77.744 \text{ kg/mol}$).

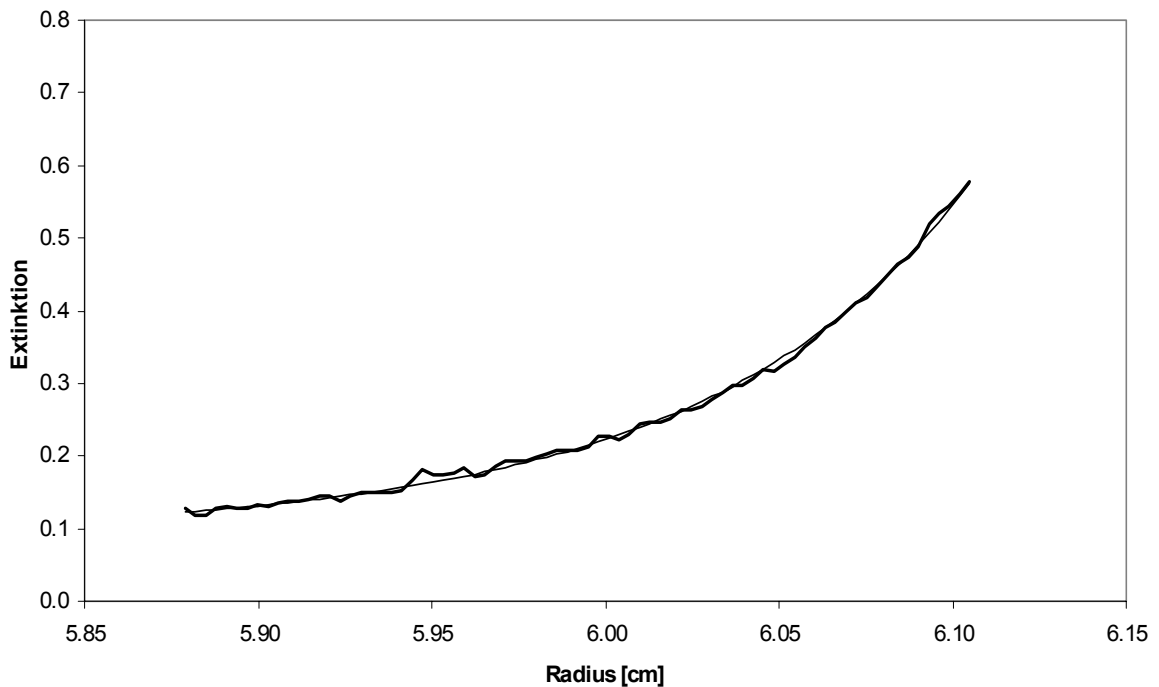


Abbildung 20: UZ-Gleichgewichtslauf mit $9 \mu\text{M}$ AthSSB-1, Bedingungen wie bei Abbildung 19. Auswertung mit BPCFit unter Annahme eines Dimerisierungsmodells (dünne Linie). $M_1 = 19.436 \text{ kg/mol}$, $n\text{-mer} = 2$, $K_{\text{ass}} = 3.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

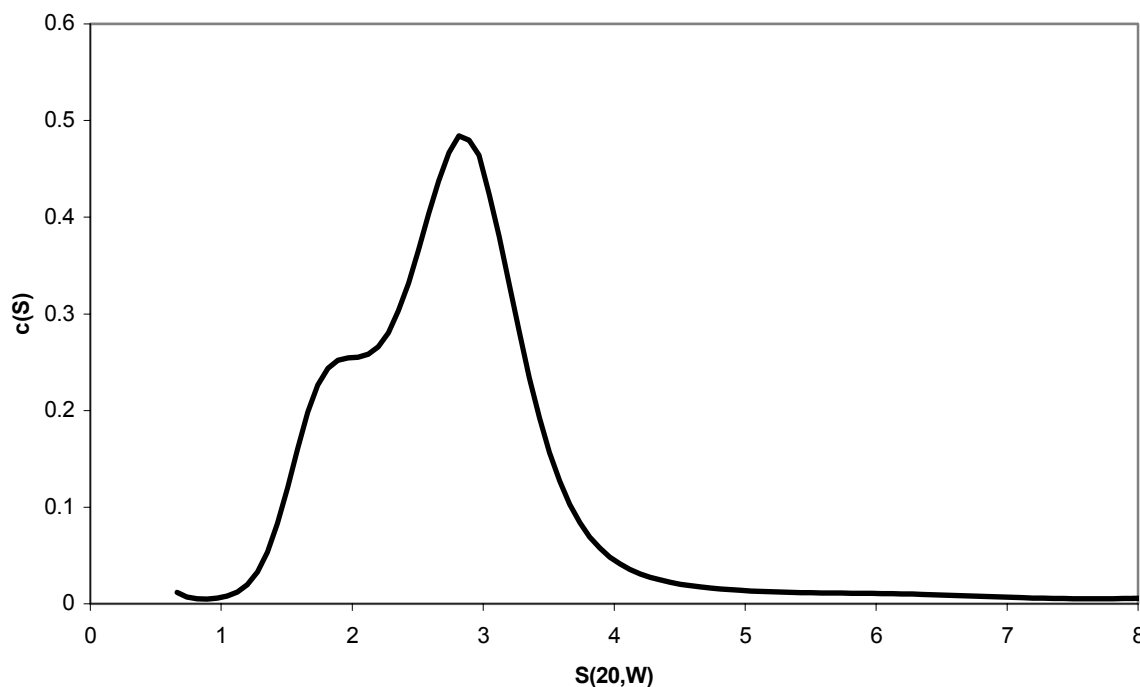


Abbildung 21: Auswertung eines UZ-Sedimentationslauf von $11 \mu\text{M}$ AthSSB-1 in 75 mM NaCl , 20 mM Kpi , $\text{pH } 7.4$ bei 230 nm , 20°C , 50.000 rpm . Auswertung mit dem Programm Sedfit (Schuck, 2000), Perrin-Faktor 1.2, korrigiert auf $s_{20,W}$.

Neben UZ-Gleichgewichtsläufen wurden auch UZ-Sedimentationsläufe durchgeführt (2.10.4). Hierfür wurde AthSSB-1 unter den gleichen Puffer-Bedingungen (75 mM NaCl , 20 mM Kpi , $\text{pH } 7.4$) bei 50.000 rpm sedimentiert, die Messung der Absorption erfolgte ebenfalls bei 230 nm . Die aufgenommenen Daten wurden mit dem Programm Sedfit (Schuck, 2000) ausgewertet (2.10.4). Hierbei wird mit gegebenem Form-Parameter die s-Wert Verteilung unter Berücksichtigung der Diffusionsverbreiterung berechnet. Anschließend wurden die s-Werte manuell auf $s_{20,W}$ korrigiert (2.10.4).

In Abbildung 21 ist die Konzentrationsverteilung der erhaltenen s-Werte dargestellt. Hier lässt sich, wie bereits im UZ-Gleichgewichtslauf, eine Heterogenität der Probe beobachten. Die s-Wert Verteilung erstreckt sich über den Bereich von ca. 1.5 S bis ca. 4 S . Das Maximum der s-Werte repräsentiert die Hauptspezies, die mit einem s-Wert von ca. 2.8 S sedimentiert. Die Schulter der Kurve im Bereich von ca. 1.9 S deutet auf eine zweite kleinere Spezies in der Probe hin. Um die Sedimentationskoeffizienten einer Spezies zuzuordnen, kann man für ein gegebenes Molekulargewicht über die Svedberg-Gleichung ihren maximalen s-Wert (s_{Kugel}) berechnen (2.10.4). Der maximale s-Wert ergibt sich unter der Annahme, dass die Spezies mit dem Reibungskoeffizienten einer Kugel (f_{Kugel}) sedimentiert. Durch den Perrin-Faktor, der das Verhältnis s_{Kugel} zu $s_{20,W}$ darstellt, erhält man dann einen Anhaltspunkt darüber, inwieweit die Form des Proteins von der Kugelform abweicht. In

Tabelle 3 sind sowohl die maximalen Sedimentationskoeffizienten gezeigt, mit denen die verschiedenen Oligomere von *AthSSB-1* sedimentieren würden, als auch die Perrin-Faktoren der Protomere von *AthSSB-1*, die sich an den beiden Maxima der s-Wert Verteilung ergeben würden.

Tabelle 3: Molmasse und maximaler Sedimentationskoeffizient von AthSSB-1 Mono- und Dimer bzw. Tetramer. Unter der Annahme, dass das Protein als Monomer, Dimer oder Tetramer bei den angegebenen s-Werten sedimentiert, ergeben sich die jeweiligen Perrin-Faktoren.

	Monomer	Dimer	Tetramer
Molmasse [kg/mol]	19.436	38.872	77.744
errechneter, maximaler s-Wert $s_{Kugel, 20, W}$	2.55 S	4.04 S	6.42 S
in UZ-Sedimentation gemessener s-Wert	ca. 1.9 S	ca. 2.8 S	
Perrin-Faktor $s_{Kugel}/s_{20, W}$ Monomer	~1.3	--	
Perrin-Faktor $s_{Kugel}/s_{20, W}$ Dimer	~2.1	~1.4	
Perrin-Faktor $s_{Kugel}/s_{20, W}$ Tetramer	~3.4	~2.3	

Der maximale s-Wert eines *AthSSB-1* Monomers liegt bei 2.55 S. Die in der s-Wert Verteilung größeren s-Werte müssen daher auf die Anwesenheit von Oligomeren zurück zu führen sein. Bei 1.9 S ergibt sich für das Monomer ein Perrin-Faktor von 1.3. Wenn das Dimer mit 2.8 S sedimentiert, ergibt sich ein Perrin-Faktor von 1.4. Die sich ergebenden Perrin-Faktoren für ein tetrameres Protein erscheinen dagegen sehr unrealistisch hoch. Zum Vergleich: eine *EcoSSB* Tetramer hat einen Perrin-Faktor von 1.4. Zudem wurde durch die Gleichgewichtszentrifugation gezeigt, dass sich in der Lösung Monomer und Dimer befinden. Die Sedimentationskoeffizienten lassen sich daher gut mit einem Gemisch aus Dimeren und Monomeren erklären.

3.6 DNA-Bindungseigenschaften von *AthSSB-1*

Um die DNA-Bindungseigenschaften von *AthSSB-1* zu untersuchen, eignen sich Titrations des Proteins mit poly(dT), woraus sich die Bindungskonstante der Assoziation (K_{ass}) und die Bedeckungslänge (n) ermitteln lassen sollten. Es wurden Titrations in der analytischen Ultrazentrifuge sowie mittels Fluoreszenz-Spektroskopie durchgeführt.

3.6.1 Analytische Ultrazentrifugation

In der analytischen Ultrazentrifuge lässt sich die Bindung eines Einzelstrang-DNA bindenden Proteins an ssDNA dadurch erkennen, dass der resultierende Komplex schneller sedimentiert als seine jeweiligen Einzelkomponenten.

Für die Titration wurde poly(dT) mit einer Länge von ca. 900 Nukleotiden (Amersham) zusammen mit *AthSSB-1* eingesetzt. Die Proben wurden in 75 mM NaCl, 20 mM KP_i , pH 7.4 bei 20°C mit 22.000 rpm zentrifugiert, die Messung der Absorption erfolgte bei 260 nm. Dabei wurden die Ansätze so gewählt, dass unterschiedliche molare Verhältnisse von Nukleotiden (N) zu *AthSSB-1* Monomer vorlagen (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Konzentrationen von *AthSSB-1* und poly(dT), die bei der Titration in der analytischen Ultrazentrifugation eingesetzt wurden.

N	Nukleotide [μM]	<i>AthSSB-1</i> [μM]
∞	34.88 μM	--
30	34.88 μM	1.16 μM
25	34.88 μM	1.4 μM
20	34.88 μM	1.7 μM
15	34.88 μM	2.3 μM
10	34.88 μM	3.48 μM
5	34.88 μM	6.97 μM

In Abbildung 22 ist exemplarisch die Verteilung der Sedimentationskoeffizienten der Ansätze $N=5$, $N=30$ und $N=\infty$ dargestellt. Die s-Wert Verteilungen wurden dabei jeweils in Sedfit (Schuck, 2000) mit einem Perrin-Faktor von 3.5 berechnet (2.10.4). Poly(dT) allein ($N=\infty$) sedimentiert mit einem s-Wert von 6 S (Abbildung 22; 1). Bei der Stöchiometrie $N=30$ erhöht sich der s-Wert auf 12 S, was auf eine Bindung von *AthSSB-1* an poly(dT) schließen lässt. Wird die *AthSSB-1* Konzentration weiter erhöht ($N=5$), so zeigt sich eine weitere Verschiebung auf ca. 22 S. Weiterhin ist bei ca. 4 S ein kleiner Peak zu erkennen, der freies Protein in dem Ansatz darstellt. In Gegenwart von *AthSSB-1* zeigen die s-Wert Verteilungen außerdem breitere Peaks. Dies ist vermutlich auf die Bindung unterschiedlich vieler *AthSSB-1* Moleküle pro poly(dT) Strang zurück zu führen, aus denen sich Unterschiede im Molekulargewicht des Komplexes und deren Sedimentationskoeffizienten ergeben.

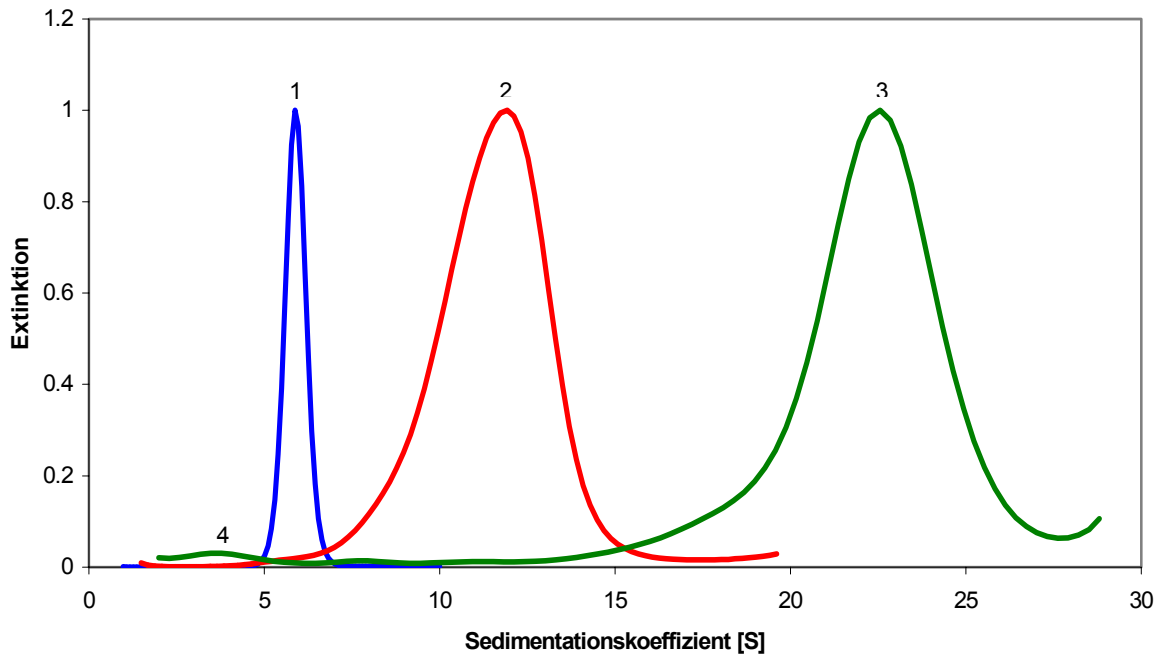


Abbildung 22: UZ-Sedimentation mit poly(dT) und AthSSB-1 in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen. Jeweils $34.88 \mu\text{M}$ poly(dT) (1) ohne AthSSB-1, (2) mit $1.16 \mu\text{M}$ ($N=30$), (3) mit $6.97 \mu\text{M}$ AthSSB-1 ($N=5$), (4) frei sedimentierendes AthSSB-1. Sedimentation bei 75mM NaCl , 20 mM KPi , $\text{pH } 7.4$, 22.000 rpm , 20°C , $E=260\text{ nm}$.

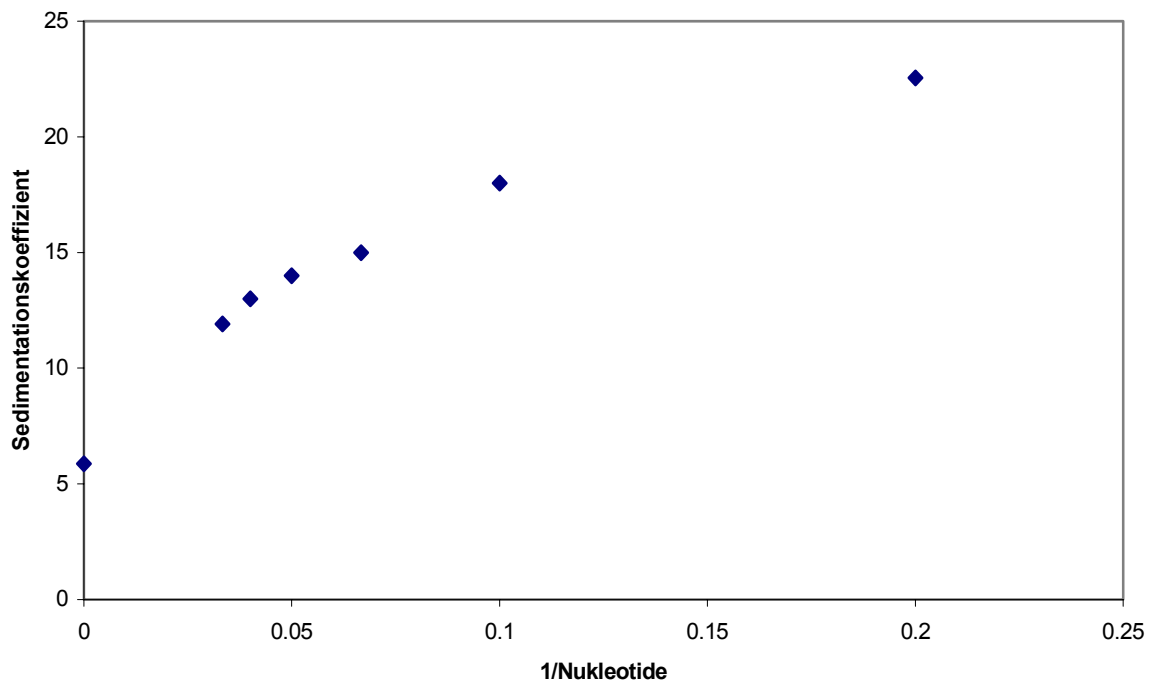


Abbildung 23: Sedimentationskoeffizienten der Mischungen von $34.88 \mu\text{M}$ poly(dT) und unterschiedlichen AthSSB-1 Konzentrationen. Ganz links ist der s -Wert von poly(dT) alleine dargestellt. Von links nach rechts erhöht sich jeweils die eingesetzte AthSSB-1 Konzentration ($N=30$ bis $N=5$, vgl. Tabelle 4). 75 mM NaCl , 20 mM KPi , $\text{pH } 7.4$, 20°C , 22.000 rpm .

Aus den *s*-Wert Verteilungen der dargestellten Ansätze lässt sich ableiten, dass die Bindung von *AthSSB-1* an poly(dT) nicht hochkooperativ erfolgt. Im hochkooperativen Fall, würde erst ein poly(dT) Strang vollständig mit *AthSSB-1* besetzt werden, bevor die Bindung an ein weiteres poly(dT) Molekül erfolgt. Da *AthSSB-1* mit $N=30$ im Unterschuss vorliegt, müsste bei hochkooperativer Bindung eine zweite Bande des freien, unbesetzten poly(dT) zu sehen sein. Die Probe mit $N=30$ sedimentiert jedoch in einer einzigen Bande (Abbildung 22; 2), was bedeutet, dass die *AthSSB-1* Proteine gleichmäßig auf den poly(dT) Strängen verteilt sind. Ein hochkooperatives Bindungsverhalten von *AthSSB-1* kann daher ausgeschlossen werden.

In einer zweiten Darstellung wurden die ermittelten Sedimentationskoeffizienten (2.10.4) gegen $1/N$ aufgetragen (Abbildung 23). Ab einem bestimmten Verhältnis sollte eine Sättigung erreicht werden, da nach Erreichen der maximalen Bedeckung der Nukleotidstränge ein Überschuss an Protein keine weitere Auswirkung auf den Sedimentationskoeffizienten des Komplexes hat. Bei der Stöchiometrie $N=5$ kann bereits freies Protein detektiert werden (vgl. Abbildung 22, 4), ob jedoch eine Sättigung bereits erreicht wurde, lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht erkennen, so dass die Bestimmung einer Bindungskonstanten (K) aus diesem Experiment nicht durchgeführt werden konnte.

3.6.2 Fluoreszenz-Titrationsen

Für mehrere Einzelstrang-DNA bindende Proteine ist bereits gezeigt worden, dass ihre Fluoreszenz durch die Bindung an einzelsträngige DNA gelöscht wird. So sind beispielsweise die beiden Tryptophanreste (W68 und W49) eines *HsmtSSB*-Monomers direkt an der DNA-Bindung beteiligt, wodurch eine Fluoreszenz-Löschung von mehr als 95 % bewirkt wird (Curth *et al.*, 1994). *AthSSB-1* besitzt 3 Tryptophanreste pro Monomer, von denen sich W122 an einer zu W68 von *HsmtSSB* homologen Position befindet. An der zu Tryptophan 49 von *HsmtSSB* homologen Position befindet sich in *AthSSB-1* ein Phenylalanin. Zu den Tryptophanresten W31 und W66 aus *AthSSB-1* gibt es in *HsmtSSB* keine homologen Aminosäuren (vgl. Abbildung 9). Für *AthSSB-1* ist durch die Bindung an poly(dT) daher eine Fluoreszenzlöschung zu erwarten.

AthSSB-1 wurde bei verschiedenen Salzkonzentrationen bei 22°C mit poly(dT) titriert. In Abbildung 24 sind die Fluoreszenz-Titrationskurven dargestellt. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Salzkonzentration die jeweilige Restfluoreszenz zunimmt. Bei 75 mM NaCl wird die Proteinfluoreszenz um ca. 70 % gelöscht, was auf eine Bindung des Proteins an poly(dT) schließen lässt. Titriert man *AthSSB-1* und poly(dT) in 150 mM NaCl, wird die Fluoreszenz nur noch um ca. 60% gelöscht.

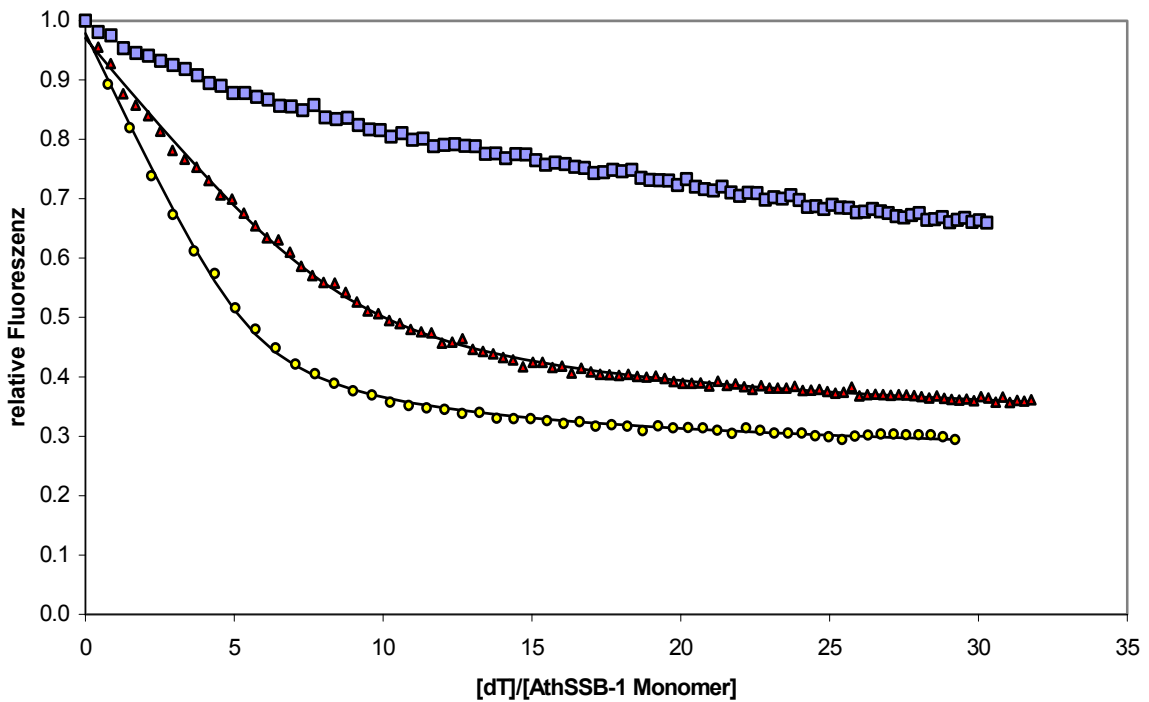


Abbildung 24: Fluoreszenz-Titration von $1.35 \mu\text{M}$ AthSSB-1 mit poly(dT) bei 20 mM KPi und unterschiedlichen Salzkonzentrationen, $T = 20^\circ\text{C}$: (\square) 0.3 M NaCl, (Δ) 150 mM NaCl, (\circ) 75 mM NaCl. Die durchgezogenen Linien stellen die jeweiligen theoretischen Bindungskurven der Titrations dar mit $K_{\text{ass}} \cdot \omega \approx 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n=11$ bei 150 mM NaCl und $K_{\text{ass}} \cdot \omega \approx 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n=7-8$ bei 75 mM NaCl.

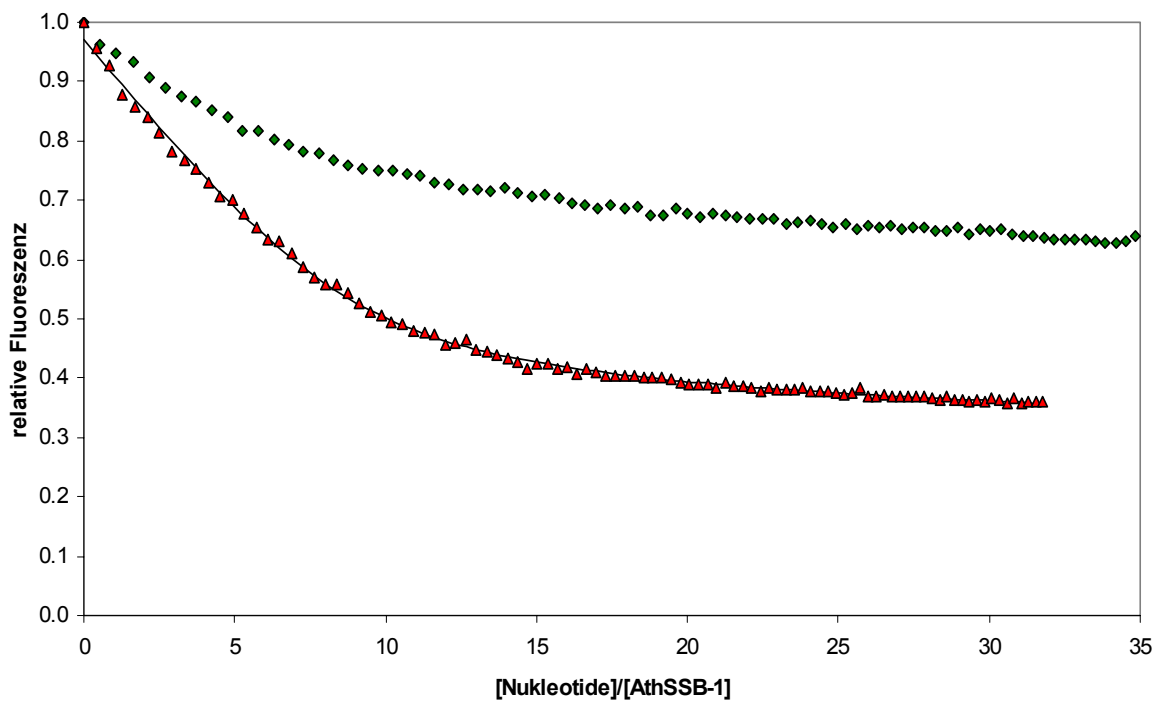


Abbildung 25: Fluoreszenz-Titrations von $1.35 \mu\text{M}$ AthSSB-1 in 150 mM NaCl, 20 mM Kpi mit poly(dT) (Δ) und poly(rU) (\diamond), $T = 20^\circ\text{C}$. Die durchgezogene Linien repräsentiert die theoretischen Bindungskurven der Titrations mit $K_{\text{ass}} \cdot \omega \approx 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n=11$ bei 150 mM NaCl

Bei Salzkonzentrationen von 0.3 M NaCl ist bei einer Stöchiometrie von 30 Nukleotiden pro *AthSSB-1* noch keine Sättigung erreicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *AthSSB-1* bei höheren Salzkonzentrationen deutlich schlechter an poly(dT) bindet als bei niedrigeren Salzkonzentrationen.

Die Bestimmung der Bindungskonstanten der Assoziation (K_{ass}) und der Bedeckungslänge (n) erfolgte mit dem Programm FLUTIT (ein von Dr. J. Greipel entwickeltes, institutsinternes Programm). Die Auswertung beruht dabei auf einem Modell für die Bindung eines vielzähligen Liganden an ein lineares Gitter (Schwarz und Watanabe, 1983). Die Bindung neben einem gebundenen Liganden erfolgt mit einer Affinität von $K_{\text{ass}} \cdot \omega$, die isolierte Bindung erfolgt mit der Bindungskonstanten K_{ass} .

Die kooperative Bindungsaffinität $K_{\text{ass}} \cdot \omega$ von *AthSSB-1* und poly(dT) in 75 mM NaCl wurde zu ca. $4 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bestimmt und die Bedeckungslänge ergibt sich zu ca. 7-8 Nukleotide pro *AthSSB-1* Monomer. Während die Affinität bei 150 mM NaCl nahezu unverändert bleibt, erhöht sich die Bedeckungslänge auf ca. 11 Nukleotide pro Monomer. Dass sich die Bedeckungslänge abhängig von der Salzkonzentration verändern kann, haben Lohman und Bujalowski (1990) für *EcoSSB* anhand unterschiedlich auftretender Bindungsmodi gezeigt. Das Protein bindet im Hochsalth ($>0.2 \text{ M NaCl}$) mit 65 Nukleotiden an poly(dT), bei Konzentrationen $<10 \text{ mM NaCl}$ verringert sich die Bedeckungslänge auf 35 Nukleotide. Da die Löslichkeit von *AthSSB-1* bei Konzentrationen $<75 \text{ mM NaCl}$ bereits sehr gering ist, konnte die Bindung bei noch niedrigeren Salzkonzentrationen nicht untersucht werden. Aufgrund der schwachen Bindung von *AthSSB-1* bei 0.3 M NaCl ist eine quantitative Bestimmung der Bindungskonstanten sowie der Bedeckungslänge auch hier nicht möglich.

Um zu testen, ob *AthSSB-1* auch an einzelsträngige RNA bindet, wie für *HsmtSSB* bereits beschrieben wurde (Curth *et al.*, 1994), wurden Fluoreszenz-Titrationen mit poly(rU) durchgeführt. Im Vergleich zu den Titrationen mit poly(dT) zeigt sich, *AthSSB-1* zwar an poly(rU) bindet, aber mit einer deutlich schwächeren Affinität (Abbildung 25).

3.6.3 Kinetische Untersuchungen

In kinetischen Untersuchungen sollte die Geschwindigkeit der Reaktion von *AthSSB-1* an poly(dT) untersucht werden. Die Messungen wurden daher mittels stopped-flow-Kinetik in 75 mM NaCl, 20 mM KPi, pH 7.4, 500 ppm Tween durchgeführt (2.10.6.1). Hierfür wurden *AthSSB-1*-Monomer und dT (Nukleotide) in einem molaren Verhältnis von 1:8 eingesetzt. Die höchsten Konzentrationen in der Messküvette betragen 6.4 μM poly(dT) und 0.8 μM *AthSSB-1*. Die Konzentrationen der folgenden Ansätze wurden jeweils um den Faktor zwei

verdünnt, die niedrigsten eingesetzten Konzentrationen betragen $1.6 \mu\text{M}$ poly(dT) und $0.1 \mu\text{M}$ AthSSB-1. Die erfolgreichen Messungen wurden für jede Konzentration akkumuliert und in Abbildung 26 graphisch aufgetragen (2.10.6.1). Die Kurven zeigen neben einem Effekt der Fluoreszenzabnahme innerhalb der ersten 0.1 s einen weiteren, deutlich langsameren Prozess. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem späteren Abfall der Fluoreszenz um einen kinetischen Effekt oder um Ausbleichung handelt, wurde eine Langzeitmessung an einem statischen Fluorimeter durchgeführt (2.10.6.2). Während beim Stopped-Flow-Gerät die Probe durchgehend mit Licht bestrahlt wird, läuft die Reaktion im statischen Fluorimeter überwiegend im Dunkeln ab. Ein Vergleich beider Messungen kann daher Aufschluss über ein mögliches Ausbleichen geben. Für die Langzeitmessung wurde die AthSSB-1 Lösung in einer Fluoreszenz-Rührküvette vorgelegt und die Messung möglichst zeitnah (innerhalb von 1-2 s) nach der Zugabe der poly(dT) Lösung gestartet. Die Konzentrationen der Lösungen wurden dabei so gewählt, dass als Endkonzentrationen $6.4 \mu\text{M}$ poly(dT) und $0.8 \mu\text{M}$ AthSSB-1 vorlagen, was dem am höchstkonzentrierten Ansatz aus der Stopped-Flow-Kintik entspricht.

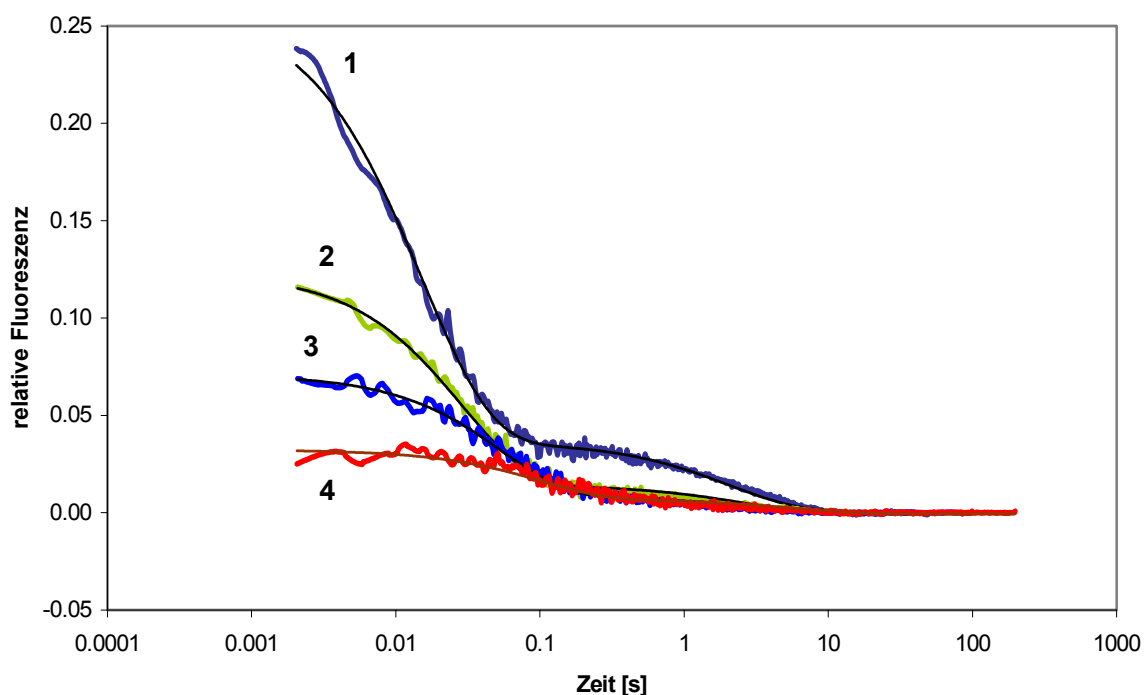


Abbildung 26: Stopped-flow Kinetik von AthSSB-1 und poly(dT) in 75 mM NaCl , 20 mM KPi , $\text{pH } 7.4$, 500 ppm Tween , 20°C , Konzentrationen in der Messküvette: **1**) (dunkelblau) $6.4 \mu\text{M}$ poly(dT), $0.8 \mu\text{M}$ AthSSB-1; **2**) (grün) $3.2 \mu\text{M}$ poly(dT), $0.4 \mu\text{M}$ AthSSB-1; **3**) (blau) $1.6 \mu\text{M}$ poly(dT), $0.2 \mu\text{M}$ AthSSB-1; **4**) (rot) $0.8 \mu\text{M}$ poly(dT), $0.1 \mu\text{M}$ AthSSB-1. Normierte Kurven mit Basislinie. Die Anpassung der theoretischen Kurven erfolgte mit BPCFit mit $n=16$, $K=3.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Einer schnellen Reaktion, in der das Dimer an poly(dT) bindet $k_{\text{ass}}(D+nA)$ ca. $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ folgt die Nachbildung des Dimers mit $k_{\text{ass}}(M+M) = 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

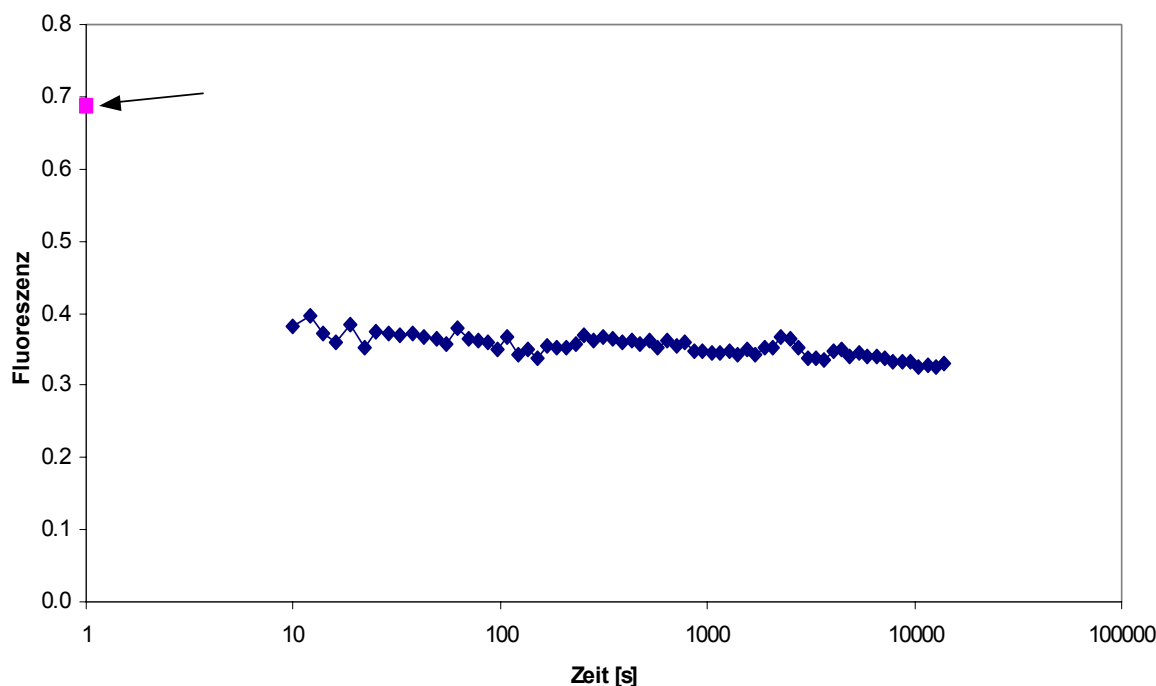


Abbildung 27: Fluoreszenzmessung am statischen Fluorimeter: $0.8 \mu\text{M}$ AthSSB-1 mit $6.4 \mu\text{M}$ poly(dT) in 75 mM NaCl , 20 mM KPi , $\text{pH } 7.4$, 500 ppm Tween , bei 20°C . Vor Zugabe von poly(dT) wurde die Proteinfluoreszenz von AthSSB-1 bestimmt (Pfeil).

Die Fluoreszenz des Reaktionsgemisches wurde am statischen Fluorimeter über einen Zeitraum von ca. 4 h detektiert. In Abbildung 27 ist die Fluoreszenz von AthSSB-1 vor der Kinetik gezeigt. Durch Zugabe von poly(dT) verringert sich die Proteinfluoreszenz durch die Bindung um etwa die Hälfte (die zu erwartende Verringerung der Fluoreszenz durch die Verdünnung der Proteinlösung wurde in der graphischen Auftragung berücksichtigt). Über einen Zeitraum von ca. 4 h ist eine weitere Fluoreszenzabnahme jedoch nicht zu beobachten. Aufgrund dieses Ergebnisses, das einen kinetischen Effekt ab einem Reaktionszeitraum von mehr als 10 s ausschließt, wurden die aus der stopped-flow Kinetik erhaltenen Daten jeweils um eine lineare Basislinie (ab ca. 10 s) korrigiert (vgl. 2.10.6.1). Die Kurven enden so alle dem Wert Null. Die Kurven wurden dann für den Zeitbereich bis ca. 10 s unter Zugrundelegung einer Assoziationskonstanten der Monomere von $K=3.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (vgl. 3.5.2) und einer Bedeckungslänge von $n=16$ für das Dimer (die Bedeckungslänge des Monomers wurde in der Fluoreszenz-Titration mit $n=8$ bestimmt) ausgewertet. Die aus diesem Modell resultierenden Kurven sind zusammen mit den zugrunde gelegten Daten in Abbildung 26 dargestellt. Die Auswertung ergab für die Bindung des dimeren Proteins an poly(dT) eine Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{ass}}(\text{D}+n\text{A})$ von ca. $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Bildung des Dimers dagegen ist in diesem Modell deutlich langsamer. Hiernach reagieren zwei Monomere mit einer Geschwindigkeit $k_{\text{ass}}(\text{M}+\text{M})$ von ca. $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ zu einem bindungsfähigen Dimer.

3.7 Untersuchungen zur Lokalisation der *AthSSB* Proteine

Da Pflanzenzellen zwei Arten von DNA-haltigen Organellen enthalten, ist es nicht eindeutig, in welcher der beiden Organellarten (Mitochondrium oder Plastid) die an der DNA-Replikation beteiligten SSB-Proteine ihre Aufgabe erfüllen. Die Lokalisation der *AthSSB*-Proteine in der Pflanzenzelle zu bestimmen, war daher ein Ziel der Arbeit. Ein Ansatz verfolgte dabei die grundlegende Methode zur Lokalisation durch Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern. Vergleichend dazu wurden beide Aminosäuresequenzen *in silico* auf ihre Lokalisation hin untersucht.

3.7.1 *In silico* Analyse zur Lokalisation

Für die erste Einschätzung einer Lokalisation wurden die Proteinsequenzen auf putative Importsequenzen hin untersucht. Hierfür wurden jeweils die Sequenzen der Vorläuferproteine mit verfügbaren Vorhersagealgorithmen analysiert (vgl. Tabelle 5). Abweichend von der Annahme, dass die *AthSSB*-Proteine jeweils ein mitochondrielles und ein chlorplastidäres Protein darstellen, vermittelt die *in silico* Analyse den Eindruck, dass beide Proteine im Mitochondrium vorkommen. Die einzige Vorhersage für ein Vorkommen im Chloroplasten wurde über das Programm PSort V6.4 (Nakai und Kanehisa, 1992) ermittelt, bei dem *AthSSB-1* im Chloroplasten Stroma vorhergesagt wird.

Tabelle 5: Analyse der Proteinsequenzen von *AthSSB-1* und *AthSSB-2* auf putative Importsequenzen mittels verschiedener Vorhersagealgorithmen. cTP=chloroplast transit peptide

Programm	<i>AthSSB-1</i>	<i>AthSSB-2</i>	Quelle
TRANSPEP	Mitochondrium	Mitochondrium.	(Gavel und von Heijne, 1990)
MitoProt II 1.0a4	Mitochondrium	Mitochondrium	(Claros und Vincens, 1996)
TargetP V1.0	Mitochondrium	Mitochondrium	(Emanuelsson <i>et al.</i> , 2000)
Predator	weder noch	Mitochondrium	Peeters 1999, submitted
ChloroP V1.1	kein cTP	kein cTP	(Emanuelsson <i>et al.</i> , 1999)
Psort V6.4	Chloroplast stroma	Mitochondrial matrix space	(Nakai und Kanehisa, 1992)

3.7.2 Gewinnung von Antikörpern gegen *AthSSB*

Eine gute Möglichkeit, ein Protein gezielt nachzuweisen, ist die Detektion mit einem geeigneten Antikörper. Daher wurde in ersten Untersuchungen getestet, ob die rekombinanten *AthSSB*-Proteine mit bereits vorhandenen Antikörpern gegen *EcoSSB* und gegen das humane, mitochondrielle SSB (*HsmtSSB*) nachgewiesen werden konnten. Aber weder Anti-*EcoSSB* noch Anti-*HsmtSSB* zeigten eine Kreuzreaktion mit den beiden *AthSSB*-Proteinen. Zusätzlich wurde Anti-GST-*ScmtSSB*, ein Antikörper gegen ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-transferase und dem mitochondriellen SSB aus *Saccharomyces cerevisiae* (*ScmtSSB*), im Westernblot (1:1000 Verdünnung) getestet (2.11.3). Mit diesem Antikörper konnte ebenfalls keine Kreuzreaktion gegenüber *AthSSB*-1 und *AthSSB*-2 nachgewiesen werden. Da aber Glutathion-S-transferase und die GST-Fusionsproteine GST-*AthSSB*-1 und GST-*AthSSB*-2 angefärbt wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass die Spezifität von Anti-GST-*ScmtSSB* hauptsächlich gegen GST gerichtet ist. Der Antikörper wurde daher zum Nachweis von GST-Fusionsproteinen eingesetzt (vgl. 3.3.1). Um jedoch einen Nachweis der *AthSSB*-Proteine, insbesondere zur Lokalisation in der Pflanzenzelle, zu ermöglichen, war es notwendig, spezifische gegen *AthSSB*-Proteine gerichtete Antikörper zu gewinnen.

Alle Antikörper wurden als polyklonale Antikörper aus Kaninchen gewonnen. Für den immunologischen Nachweis wurde jeweils das Komplement-inaktivierte Blutserum (2.11.2) in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt.

Zu Beginn der Arbeit stand noch kein Protein zur Verfügung, das als Antigen hätte verwendet werden können. Daher wurden zu diesem Zweck synthetische, an KLH gekoppelte Peptide eingesetzt (Fa. Affina Immuntechnik, Berlin) (siehe 2.3). Aus *AthSSB*-1 wurden dafür zwei Sequenzabschnitte von je 15 Aminosäuren ausgewählt (vgl. 2.3), die eine möglichst hohe Spezifität des Antikörper hervor bringen sollten. Um Kreuzreaktionen zu anderen SSB Proteinen zu vermeiden, wurde für Peptid AthP-1.1 ein Bereich mit mehreren geladenen Aminosäuren im N-terminalen Drittel ausgewählt (VEEDFEENVTERPE), der den anderen mitochondriellen SSBs fehlt. Peptid AthP-1.2 umfasst eine Sequenz (DQRLVGATNQPKA), die in der Struktur von *HsmtSSB* einem Loop entspricht. Eine Sequenz in einer Loopregion hat den Vorteil, dass diese exponiert und somit für Antikörper zugänglich ist. Die Antikörper wurden aus Kaninchen, wie unter 2.11.2 beschrieben, gewonnen. Sie wurden zum Nachweis von *AthSSB*-1 während der Expression und Aufreinigung eingesetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass ihre Spezifität deutlich geringer war, als die der nachfolgend erhaltenen Antikörper. Zur Bestimmung der Lokalisation wurden diese Antikörper daher nicht eingesetzt.

Die Klonierung und Aufreinigung der *AthSSB*-Proteine ermöglichte es dann, Antikörper gegen die rekombinanten Proteine zu gewinnen. Das *AthSSB*-1-Fusionsprotein wurde hierfür wie beschrieben (3.3.1) aus mit pGEX-2T(*AthSSB*-1) transformierten SG13009 Zellen aufgereinigt und mit Thrombin gespalten. Nach 15 min wurde die Spaltung abgestoppt und die Spaltprodukte über eine präparative SDS-PAGE getrennt. Die Bande des reifen *AthSSB*-1 (19 kDa) wurde ausgeschnitten und als Antigen eingesetzt (vgl. 2.11.2).

AthSSB-2 wurde als Fusionsprotein über Glutathion Separose aufgereinigt und mit PreScission Protease gespalten (vgl. 3.4). Das Eluat wurde ebenfalls über SDS-PAGE getrennt die entsprechende Bande bei 21 kDa ausgeschnitten und zur Immunisierung eingesetzt.

In einer 1:1000 Verdünnung konnte im Westernblot mit beiden Antikörper (Anti-*AthSSB*-1 und Anti-*AthSSB*-2) 1 ng des jeweiligen rekombinanten Proteins nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion konnte weder bei Anti-*AthSSB*-1 gegenüber *AthSSB*-2 noch bei Anti-*AthSSB*-2 gegenüber *AthSSB*-1 festgestellt werden.

3.7.3 Westernblot von Proteinextrakten aus *Arabidopsis*

Zuerst wurde untersucht, ob *AthSSB*-Proteine in Proteinextrakten aus *Arabidopsis* nachweisbar sind. Proben eines Proteinextrakts aus *Arabidopsis* Blättern (2.4.2) wurden daher im Westernblot (2.11.3) mit Anti-*AthSSB*-1 und Anti-*AthSSB*-2 als primären Antikörper behandelt. Die colorimetrische Färbung der Blotmembran (2.11.3) zeigte nach der Behandlung mit dem *AthSSB*-1 Antikörper eine einzelne Bande auf Höhe von ca. 32 kDa (vgl. Abbildung 28, Blot A, Spur 2). Im Vergleich zu dem als Referenz aufgetragenen rekombinanten *AthSSB*-1 erscheint die Bande mit 32 kDa zu groß, um das entsprechende Protein darzustellen. Um zu testen, ob es sich bei der Bande um eine unspezifische Reaktion handelt, wurde zur Kontrolle das entsprechende Präimmenserum (2.11.2) zum Westernblot eingesetzt. Da hier keine Proteinbande detektiert wurde (nicht gezeigt), konnte weitgehend ausgeschlossen werden, dass es sich bei der vorherigen Färbung des 32 kDa Proteins um eine unspezifische Reaktion handelt.

Weiterhin wurde getestet, inwiefern das Ergebnis des Westernblots durch vorherige Immunpräzipitation verändert wird, um dadurch die Spezifität des Antiserums einzugrenzen. Dafür wurde der *AthSSB*-1 Antikörper mit 0.2 µg/µl rekombinantem *AthSSB*-1 versetzt, und für 40 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation sollten sich im Überstand des Präzipitats keine spezifisch gegen *AthSSB*-1 gerichteten Antikörper mehr befinden. Der Überstand wurde dann, wie zuvor das unbehandelte Antiserum, in einer 1:1000 Verdünnung

im Westernblot eingesetzt. Weder eine Bande im Proteinextrakt noch das rekombinante *AthSSB-1* konnte mit diesem vorbehandelten Antiserum detektiert werden (Abbildung 28, Blot B).

In einer zweiten Immunpräzipitation wurde das *AthSSB-1*-Antiserum mit ca. 0.2 µg/µl rekombinanter Glutathion-S-Transferase wie zuvor inkubiert. Auf diese Weise sollten mögliche Antikörper gegen GST ausgefällt werden. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der verbleibende Überstand im Westernblot eingesetzt (1:1000). Hiermit konnte, genau wie beim unbehandelten Anti-*AthSSB-1*, die 32 kDa Bande sowie das Referenzprotein *AthSSB-1* nachgewiesen werden (Abbildung 28, Blot C). Es ist daher unwahrscheinlich, dass in der Antigenpräparation aus dem GST-Fusionsprotein (vgl. 3.3.1.2) GST-Verunreinigungen vorhanden waren, die zu einer Produktion von Antikörpern gegen GST geführt hätten. Diese Folgerung wird zusätzlich dadurch gestützt, dass der hauptsächlich gegen GST gerichtete GST-*ScmtSSB*-Antikörper im Westernblot weder die 32 kDa Bande noch das *AthSSB-1* detektieren konnte.

Der Antikörper gegen *AthSSB-2* konnte hingegen keinen immunologischen Nachweis im Ganzzell-Lysat erbringen (nicht gezeigt).

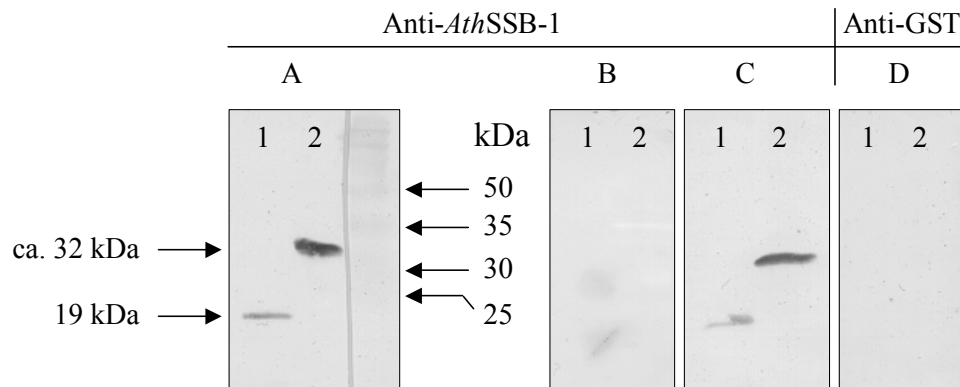


Abbildung 28: Westernblot mit rekombinantem *AthSSB-1* (1) und Ganzzell-Lysaten (ca. 13 µg Gesamtprotein) aus *Arabidopsis* Blättern (2). Behandlung der Membran mit (A) Anti-*AthSSB-1*, (B) Anti-*AthSSB-1* nach Immunpräzipitation mit *AthSSB-1*, (C) Anti-*AthSSB-1* nach Immunpräzipitation mit GST, (D) Anti-GST-*ScmtSSB*, Rainbow-Marker RPN 800 (Amersham). Einzelheiten vgl. Text.

3.7.4 Nachweis von *AthSSB-1* im Mitochondrien Proteom

Für die Untersuchung des Mitochondrien-Proteoms von *Arabidopsis thaliana* wurden von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Braun (Universität Hannover, Abteilung für angewandte

Genetik) die folgenden Vorarbeiten durchgeführt (vgl. auch 2.11.4): Die Mitochondrien wurden aus im Dunkel angezogenen Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana* durch differentielle Zentrifugation mit anschließender Percoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Werhahn *et al.*, 2001; Kruft *et al.*, 2001). Die Mitochondrien wurden aufgeschlossen und das Proteom über eine isoelektrische Fokussierung (2.11.4) mit anschließender SDS-PAGE (2D-Gel) aufgetrennt (Kruft *et al.*, 2001). Ein Kontrollgel wurde mit Coomassie gefärbt (vgl. Abbildung 29, oben), die Proteine eines zweiten Gels wurden beim Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran immobilisiert. Die so vorbereitete Membran wurde freundlicherweise für die weitere Behandlung mit Antikörpern zur Verfügung gestellt.

Die Behandlung der Membran mit den gegen *AthSSB* gerichteten Antikörpern wurde wie unter 2.11.4 beschrieben durchgeführt. Mit Anti-*AthSSB*-1 ließen sich zwei definierte Spots auf der Membran detektieren (vgl. Abbildung 29, unten). Nach Dokumentation der Spots wurde die Membran mit Antikörpern gegen Cytochrom-Reduktase 1 und Cytochrom-Reduktase 2 sowie mit unspezifischen, gegen pflanzliche Proteine gerichtete Antikörper (alle von AG Braun) behandelt (vgl. Abbildung 29, Mitte), um die Position der Spots eingrenzen zu können. Im Vergleich zu bereits identifizierten Proteinen (vgl. Abbildung 29, Pfeile) aus dem *Arabidopsis mitochondrial proteome project* (Kruft *et al.*, 2001; Werhahn und Braun, 2002), kann dann die Größe der detektierten Spots sowie deren isoelektrischer Punkt abgeschätzt werden. Anders als bei dem Westernblot des Gesamt-Proteinextraktes, liegen die Proteine hier etwa auf einer Höhe von ca. 20-22 kDa. Der isoelektrische Punkt beträgt ca. pI=7. Sowohl das Molekulargewicht als auch der isoelektrische Punkt stimmen sehr gut mit den theoretischen Daten für das rekombinante Protein (19-22 kDa, pI 7.7) überein.

Der Vergleich des Blots mit einem im Parallelansatz hergestellten Coomassie gefärbten 2D-Gel (Abbildung 29 ;Oben) zeigt an den entsprechenden Stellen keinen Nachweis eines Proteins. Das Protein scheint nur in geringen Mengen im Proteom der Mitochondrien vorhanden zu sein. Für eine Ansequenzierung des detektierten Proteins stand daher nicht ausreichend Material zur Verfügung.

Dasselbe Experiment wurde entsprechend mit Anti-*AthSSB*-2 durchgeführt. Hier konnte jedoch kein immunologischer Nachweis erbracht werden (nicht gezeigt).

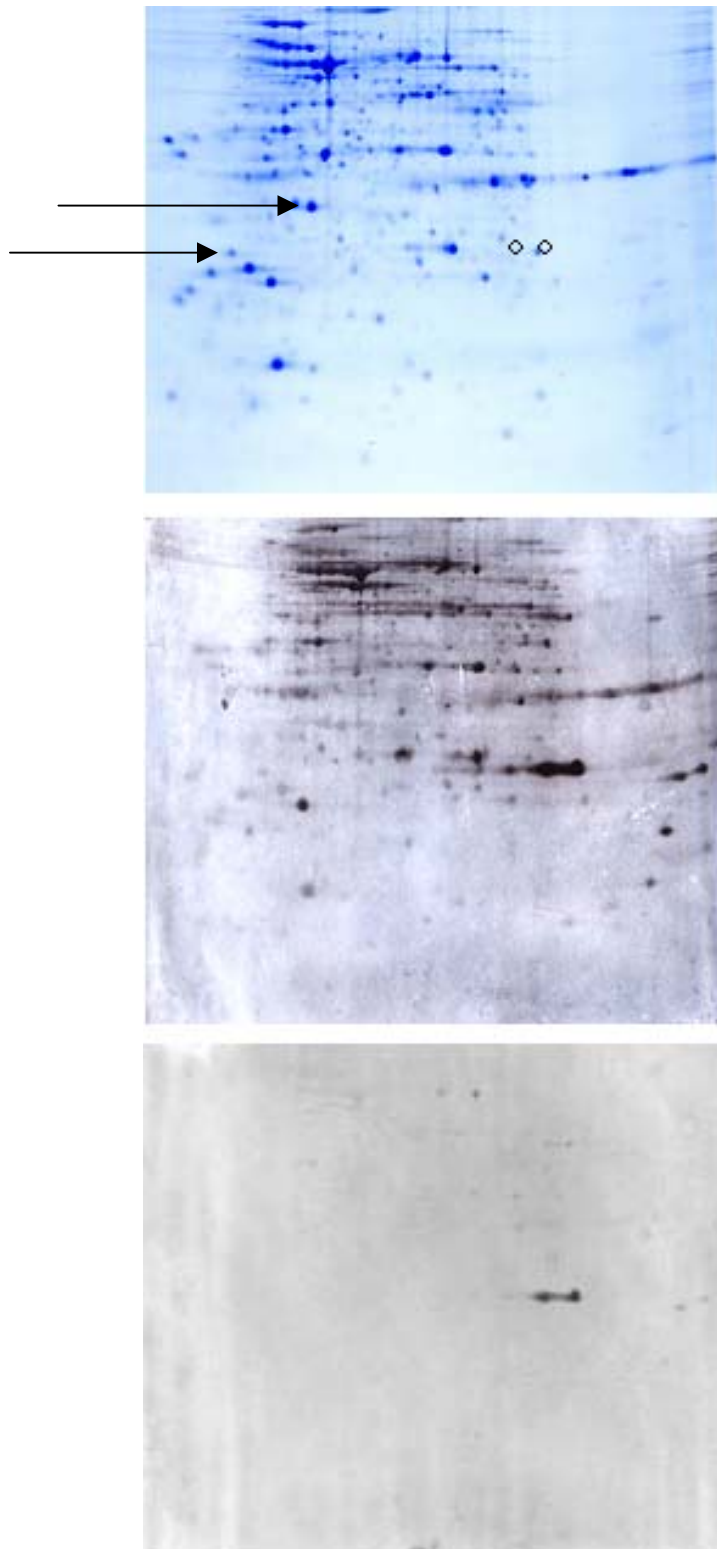


Abbildung 29: IEF/SDS-PAGE Coomassie gefärbt (oben) bzw. mit anschließendem Westernblot. Mit einem gegen AthSSB-1 gerichteten Antikörper lassen sich nach IEF/SDS-PAGE zwei Proteine detektieren (unten), deren Position auf dem Coomassie gefärbten Gel durch schwarze Kreise dargestellt ist (oben). Zur Bestimmung der Position der Spots wurde die Membran mit unspezifischen Antikörpern behandelt (Mitte) (vgl. 2.11.4) Die Größe der detektierten Proteine wurde aufgrund von bekannten Proteinspots näher definiert, vgl. Text. Pfeil oben= ~ 22 kDa; unten= ~ 18 kDa



Abbildung 30: Pflanzenschnitt aus *Arabidopsis* Blättern behandelt mit Anti-AthSSB-1 und goldmarkiertem Protein A. Die Pfeile kennzeichnen exemplarisch die Färbung durch Protein mit Goldpartikeln (vgl. 2.11.5).

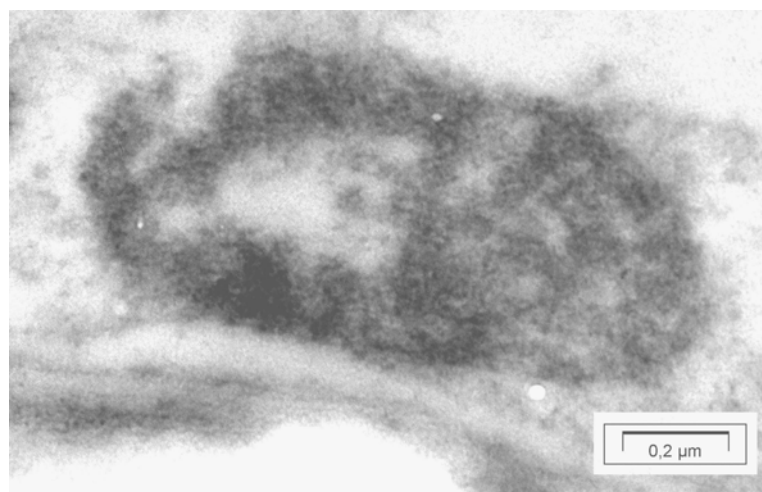


Abbildung 31: Pflanzenschnitt aus *Arabidopsis* Blättern (Mitochondrium). Behandlung mit Anti-AthSSB-1 und an Goldpartikel gekoppeltem Protein A (vgl. 2.11.5).

3.7.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um die Untersuchungen zur Lokalisation zu erweitern, wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Neumann am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) Schnitte von *Arabidopsis* Blättern angefertigt, die zur immunhistochemischen Färbung verwendet werden sollten. Die Schnitte wurden vorbereitet und fixiert (2.11.5) und mit Antiseren von *AthSSB-1* und *AthSSB-2* behandelt. Protein A wird nach Bindung an die primären Antikörper unter dem Elektronenmikroskop (EM) durch an das Protein gekoppelte Goldpartikel sichtbar.

Die Behandlung der Präparate mit Anti-*AthSSB-1* ergab keinen Nachweis im Mitochondrium (vgl. Abbildung 31). Dafür konnte in den Plastiden eine positive Reaktion aufgezeigt werden (vgl. Abbildung 30). Die Goldpartikel (die Position ist exemplarisch durch Pfeile gekennzeichnet) sind in geringer Anzahl vorhanden und liegen verstreut im Plastiden vor. Die Behandlung der Schnitte mit den entsprechenden Präimmunseren ergab keinen immunhistochemischen Nachweis (nicht gezeigt).

4 Diskussion

Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus Bakterien – insbesondere das SSB-Protein aus *E.coli* (*EcoSSB*) – sind sehr gut charakterisiert. Sie weisen eine Homologie zu den eukaryotischen, Einzelstrang-DNA bindenden Proteinen aus Mitochondrien (mtSSBs) auf, die sich besonders in der Strukturhomologie widerspiegelt. Die Organismen, deren mtSSBs bisher beschrieben wurden, repräsentieren Vertreter aus unterschiedlichen Klassen des Tierreiches (Säuger, Amphibien, Seeigel, Insekten) sowie aus Hefe. Die Identifizierung eines pflanzlichen SSB-Proteins, die bis zu dieser Arbeit nicht gelungen war, gibt die Möglichkeit, vergleichende Untersuchungen der SSB-Proteine auf das Reich der Pflanzen auszudehnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene zweier Einzelstrang-DNA bindender Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (*AthSSB*) identifiziert und die rekombinanten Proteine in *E.coli* exprimiert. Mit Hilfe biophysikalischer Methoden wurde *AthSSB-1* anschließend charakterisiert.

4.1 Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus *Arabidopsis thaliana*

Mitochondrielle Einzelstrang-DNA bindende Proteine sind von essentieller Bedeutung für den jeweiligen Organismus (Van Dyck *et al.*, 1992). Mitochondrielle SSB-Proteine sollten daher in allen eukaryotischen Organismen – auch in Pflanzen – eine Rolle spielen. Da Pflanzenzellen mit den Plastiden einen weiteren DNA-haltigen Organelltyp enthalten, würde man bei pflanzlichen Organismen sowohl mitochondrielle als auch plastidäre SSB-Proteine erwarten.

Zur Identifizierung solcher pflanzlichen Einzelstrang-DNA bindenden Proteine (SSBs), die zu den mitochondriellen SSB-Proteinen homolog sind, wurden die Datenbanken unterschiedlicher Sequenzierprojekte von Pflanzen (u.a. *Arabidopsis*, Reis, Tomate) durchsucht. Zu Beginn der Arbeit war das *Arabidopsis thaliana* Sequenzierprojekt (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) am weitesten fortgeschritten (Abschluss Ende 2000), so dass die Möglichkeit ein zum humanen mitochondriellen SSB (*HsmtSSB*) homologes Protein zu finden, hierbei am größten war. Zwei Aminosäuresequenzen potentieller Einzelstrang-DNA bindender Proteine wurden in der *Arabidopsis*-Datenbank identifiziert, deren Sequenzen zu der von *HsmtSSB* homolog sind. Sie werden in der vorliegenden Arbeit mit *AthSSB-1* und *AthSSB-2* bezeichnet. Die Proteine könnten ein mitochondrielles sowie ein chloroplastidäres SSB-Protein darstellen (Tomaska *et al.*, 2001). Durch das stete

Fortschreiten der Sequenzierprojekte stehen inzwischen weitere DNA-Sequenzen höherer Pflanzen in den Datenbanken zur Verfügung. So ist beispielsweise die Sequenzierung des Reisgenoms inzwischen abgeschlossen (Goff *et al.*, 2002). Führt man zum jetzigen Zeitpunkt eine Homologie-Suche mit der Sequenz von *AthSSB-1* bei Reis durch, so lassen sich dort weitere Annotationen potenzieller SSB-Proteine finden (z.B. Acc.-Nr. AP003725).

Die Gene von *AthSSB-1* und *AthSSB-2* wurden aus einer cDNA Bank von *Arabidopsis thaliana* amplifiziert. Die annotierte Sequenz des *AthSSB-2*-Gens wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz der cDNA von *AthSSB-1* entsprach jedoch nicht der Annotation des Gens in der Datenbank. Da für die meisten in der Datenbank hinterlegten Gensequenzen eukaryotischer Organismen die Zuordnung von Introns und Exons mittels Computervorhersage ermittelt wird, kann aus einer fehlerhaften Vorhersage der Spleißstellen eine falsch abgeleitete Annotation resultieren. Die von dem Datenbankeintrag abweichende cDNA-Sequenz, die für *AthSSB-1* ermittelt wurde, ist auf eine solche fehlerhafte Intron/Exon Zuordnung zurückzuführen. Die in dieser Arbeit ermittelte korrekte Sequenz wurde daraufhin in der EMBL Datenbank hinterlegt (Acc.Nr.: AJ582222).

Zur Charakterisierung sollte das Protein möglichst unverändert (nicht als Fusionsprotein) vorliegen. Die Expression der *AthSSB*-Proteine wurde daher in verschiedenen Systemen getestet. Keines der Systeme führte jedoch zu einer detektierbaren Expression. Offensichtlich wird das Protein in der *E.coli* Zelle abgebaut. Dies könnte auf die generelle Problematik zurückzuführen sein, die eine Expression heterologer Proteine in *E.coli* mit sich bringt. Oft werden artfremde oder anomale Proteine, und als solches muss *AthSSB-1* in *E.coli* betrachtet werden, durch die La-Protease abgebaut (Goldberg, 1992). Die Verwendung eines La-Protease defizienten *E.coli* Stamms (BL21(DE3)pLysS) zeigte jedoch, dass der Abbau des Proteins nicht (nur) auf die La-Protease zurückzuführen sein kann. Da in diesem Stamm keine Expression induziert werden konnte, könnte der Abbau der *AthSSB*-Proteine noch auf weiteren Faktoren beruhen. So spielen für die Expression eukaryotischer Proteine in *E.coli* auch die verwendeten Codons eine Rolle. In Eukaryoten ist die Häufigkeit der benutzten Codons anders verteilt als in Bakterien. Für *E.coli* konnte gezeigt werden, dass die Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CGA, CGG, CCC, UCG sehr selten verwendet werden (Zhang *et al.*, 1991). Das hat zur Folge, dass auch die entsprechenden tRNAs in *E.coli* nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen. Werden nun eukaryotische Proteine in *E.coli* exprimiert, bei denen einige Aminosäuren durch seltene Codons codiert werden, so kann das zu einer fehlerhaften oder unvollständigen Translation führen. *AthSSB-1* besitzt 12 in *E.coli* selten vorkommende Codons, *AthSSB-2* sogar 22. Um diesem Problem entgegen zu wirken, wurde

das Expressionssystem in Rosetta (DE3) pLysS getestet. Dieser Stamm ist ebenfalls defizient für die La-Protease und verfügt zudem über ein Plasmid, das für zusätzliche tRNAs codiert, was sich begünstigend auf die Expression eukaryotischer Proteine auswirken kann. Obwohl für alle seltenen Codons, die im *AthSSB-1*-Gen vorkommen, durch den Rosetta-Stamm tRNAs codiert werden, konnte trotzdem keine Expression erreicht werden. Die Expression von *AthSSB-2* hingegen konnte induziert werden, auch wenn nicht für alle seltenen Codons zusätzliche tRNAs vorhanden waren. Der Grund für die fehlende Expression beruht offensichtlich nicht auf dem Expressionssystem selbst, sondern auf dem Abbau der Proteine, wobei sich die Art des Abbaus der beiden Proteine vermutlich unterscheidet. *AthSSB-2* befand sich nach Aufschluss der Zellen zu mehr als 95 % im Pellet, sehr wahrscheinlich als *inclusion bodies*. Zwar konnte das Protein mit Guanidiniumchlorid aus dem Pellet gelöst werden, bei der anschließenden Dialyse zur Entfernung des Guanidiniumchlorids blieb das Protein jedoch nicht in Lösung. Insgesamt erwies sich der Versuch, die *AthSSB*-Proteine nativ zu exprimieren als ungeeignet.

In einem weiteren Ansatz wurde daraufhin das GST-Fusions-System gewählt, in dem die *AthSSB*-Proteine ohne putative Importsequenz an Glutathion-S-transferase fusioniert exprimiert werden. Die Expression als Fusionsprotein hat den Vorteil, dass durch den Fusionsanteil eine schnelle Aufreinigung über Affinitätschromatographie erreicht werden kann und die Löslichkeit der Proteine erhöht wird. Beide *AthSSB*-Proteine konnten in Fusion mit Glutathion-S-transferase exprimiert werden. Die Aufreinigung erfolgte über Affinitätschromatographie, die Verunreinigung der Fusionsproteine durch RNA konnte durch vor dem Zellaufschluss zugegebene RNase entfernt werden. Mit dieser Methode konnte ein zu mehr als 95 % sauberes *AthSSB-1*-Protein gewonnen werden. *AthSSB-2* lag dagegen nur mit einer Reinheit von weniger als 90 % vor.

Da bislang nur *AthSSB-1* in einer befriedigenden Menge und Reinheit hergestellt werden konnte, wurde nur dieses Protein biophysikalisch charakterisiert.

4.2 *AthSSB-1* bildet Dimere

Mitochondrielle Einzelstrang-DNA bindende Proteine liegen als Homotetramere vor (Curth *et al.*, 1994; Li und Williams, 1997). Aus den Quervernetzungsexperimenten (Crosslink) mit *AthSSB-1* ließ sich ableiten, dass *AthSSB-1* ebenfalls in der Lage ist, Oligomere zu bilden. Im Gegensatz zu der im Crosslink von *EcoSSB* auftretenden Proteinleiter mit vier unterschiedlich vernetzten Protomeren (Genschel, 1995), zeigten sich bei *AthSSB-1* nur zwei

Vernetzungsgrade (Monomer und Dimer). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass *AthSSB-1*, anders als *EcoSSB*, möglicherweise als Dimer vorliegt. Mit Hilfe von Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation konnte weiterhin gezeigt werden, dass *AthSSB-1* in Lösung aus zwei Spezies besteht, die offensichtlich die monomere und dimere Form von *AthSSB-1* repräsentieren. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der Sedimentations-Diffusionsgleichgewichts-Zentrifugationen, die sich durch das Vorliegen eines Gleichgewichtes zwischen Monomer und Dimer erklären lassen. Die ermittelte Gleichgewichtskonstante zwischen Monomer und Dimer betrug dabei $K_{\text{ass}}=3.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Die aus den Sedimentations-Geschwindigkeitsläufen abgeleiteten Perrin-Faktoren für Monomer und Dimer liegen bei 1.3 bzw. 1.4. Dies weist auf eine von der kompakt gefalteten Kugel abweichende Form hin. Nach Uversky (2002) ergibt sich für ein denaturiertes Protein mit der Molmasse von *AthSSB-1* dagegen ein Perrin-Faktor von 2.2-2.3. Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Perrin-Faktoren zeigt daher, dass das *AthSSB-1* Protein nicht komplett entfaltet sein kann. Vielmehr weisen die Perrin-Faktoren auf ein ordentlich gefaltetes Protein hin. Dafür spricht auch, dass die Perrin-Faktoren von *HsmtSSB* (1.33) (Curth *et al.*, 1994) und *EcoSSB* (1.46) (Williams *et al.*, 1983) im selben Größenbereich liegen, wie die von *AthSSB-1*.

4.3 DNA-Bindungseigenschaften von *AthSSB-1*

Da *AthSSB-1* nur aufgrund von Sequenzhomologien in die Gruppe der SSB-Proteine eingeordnet wurde, war es von entscheidender Bedeutung, die Wechselwirkung des Proteins mit Nukleinsäuren zu charakterisieren. In Titrationen in der analytischen Ultrazentrifuge konnte klar gezeigt werden, dass *AthSSB-1* an poly(dT) bindet. Die Fähigkeit zur DNA-Bindung wurde außerdem mit Fluoreszenz-Titrationen untersucht, da für Einzelstrang-DNA bindende Proteine bereits gezeigt wurde, dass ihre Proteinfluoreszenz durch Bindung an einzelsträngige DNA gelöscht wird (Curth *et al.*, 1994). Es zeigte sich, dass die Proteinfluoreszenz von *AthSSB-1* durch Zugabe von poly(dT) gelöscht wird, was ebenfalls auf eine Bindung des Proteins an die DNA schließen lässt. Die Fluoreszenz-Löschung (70% bei 75 mM NaCl) verringert sich mit steigender Salzkonzentration. *HsmtSSB* bewirkt bei der Bindung an poly(dT) (0.3 M NaCl) eine Fluoreszenzlöschung von mehr als 90 % (Curth *et al.*, 1994). *HsmtSSB* besitzt zwei Tryptophanreste pro Monomer, von denen beide direkt an der DNA-Bindung und damit an der Fluoreszenzlöschung beteiligt sind (Curth *et al.*, 1994). Von den drei Tryptophanresten, die ein *AthSSB-1* Monomer besitzt, ist nur Tryptophan 122 zu einem der Tryptophanreste von *HsmtSSB* (W68) homolog. Zu den an Position 31 und 66

liegenden Tryptophanresten von *AthSSB-1* gibt es in *HsmtSSB* keine homologen Aminosäuren (Abbildung 9). Es ist denkbar, dass nur Tryptophan 122 von *AthSSB-1* – aufgrund der homologen Position zu *HsmtSSB* – an der DNA-Bindung beteiligt ist, während die anderen beiden Tryptophanreste keine für die DNA-Bindung relevante Rolle spielen. Wenn die Fluoreszenz von Tryptophan 31 und 66 bei der DNA-Bindung unverändert bliebe, würde das die im Vergleich zu *HsmtSSB* geringere Fluoreszenzlöschung erklären. Diese Überlegung wäre auch mit den Ergebnissen von Thommes *et al* (1995) in Einklang zu bringen. Die Autoren haben bei Fluoreszenz-Titrations von Einzelstrang-DNA bindendem Protein aus *Drosophila melanogaster* (*DmmtSSB*) mit poly(dT) ebenfalls eine Löschung der Fluoreszenz von ca. 60 % erhalten. Dieses Protein besitzt wie *HsmtSSB* zwei Tryptophanreste. Doch ähnlich wie bei *AthSSB-1*, befindet sich nur an der zu Tryptophan 68 von *HsmtSSB* homologen Position ein Tryptophanrest in *DmmtSSB*. Die Restfluoreszenz der Titration von *DmmtSSB* könnte auf den zweiten, nicht direkt an der DNA-Bindung beteiligten, Tryptophanrest zurückzuführen sein.

Die kooperative Bindungsaffinität ($K_{\text{ass}} \cdot \omega$) von *AthSSB-1* zu poly(dT) wurde in Fluoreszenz-Titrations in 75 mM NaCl zu ca. $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Bei der UZ-Sedimentation von *AthSSB-1* und poly(dT) konnte eine hochkooperative Bindung ausgeschlossen werden, da bei Proteinüberschuss neben der Komplexbande kein freies poly(dT) sedimentierte. Die Auswertung von $K_{\text{ass}} \cdot \omega$ erfolgte nach dem Modell von Schwarz und Watanabe (1983). Greipel *et al.* (1987) haben für *EcoSSB* gezeigt, dass die Kooperativität der Wechselwirkung im Bereich zwischen $\omega=50$ und $\omega=250$ liegt. Da die Kooperativität nicht hoch sein kann, wurde in Analogie zu *EcoSSB* $\omega=50$ angenommen. Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 150 mM NaCl bewirkt nahezu keine Veränderung der Bindungskonstanten von *AthSSB-1* ($K_{\text{ass}} \cdot \omega = 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$). Wird die Salzkonzentration hingegen auf 0.3 M NaCl erhöht, so ist die Bindung von *AthSSB-1* an poly(dT) bereits so deutlich geschwächt, dass sich die Bindungskonstante in Fluoreszenz-Titrations nicht mehr bestimmen lässt. *HsmtSSB* bindet mit einer deutlich höheren Affinität an poly(dT) (Curth *et al.*, 1994). Mit $K_{\text{ass}} \cdot \omega$ größer als $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ liegt die Bindungsaffinität um mindestens zwei Größenordnungen über der von *AthSSB-1*. Die Bindungskonstante des Einzelstrang-DNA bindenden Proteins aus *Paracentrotus lividus* (*PlmtSSB*) an Oligonukleotide liegt sogar um noch eine Größenordnung höher ($K_{\text{ass}} = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$; Roberti *et al.*, 1997). *AthSSB-1* bindet damit offensichtlich schwächer an einzelsträngige DNA als andere mitochondrielle SSB-Proteine. Ein ähnliches Bindungsverhalten wurde für die dimere *EcoSSB* Mutante Y78R beschrieben (Landwehr *et al.*, 2002). *EcoSSB* Y78R bildet, im Gegensatz zum homotetrameren *EcoSSB* Wildtyp, stabile Dimere aus. Diese Proteine können an poly(dT) binden, die Bindungsaffinität

der dimeren Mutante ist jedoch im Vergleich zum tetrameren Wildtyp deutlich reduziert. Es ist daher denkbar, dass *AthSSB-1* als dimeres Protein *per se* schwächer an einzelsträngige DNA bindet als die tetrameren SSB-Proteine. Andererseits lassen Untersuchungen des Einzelstrang-DNA bindenden Proteins aus *Mus musculus* (*MmmtSSB*) die Vermutung zu, dass die Bindungskonstante von *AthSSB-1 in vivo* höher sein könnte. Li und Williams (1997) beschreiben, dass sich die Importsequenz inhibierend auf die Bindungsfähigkeit des Proteins auswirkt, da die ssDNA-Bindungsaktivität des Vorläuferproteins im *Gel mobility shift assay* deutlich schwächer ist als die des reifen Proteins. Da ein ebenfalls getestetes GST-Fusionsprotein seine Bindungsfähigkeit beibehalten hat, schließen die Autoren aus, dass nur sterische Gründe für die Inhibierung des Vorläuferproteins verantwortlich sind. Da die Importsequenz für *AthSSB-1* nur auf einer Vorhersage beruht, besteht die Möglichkeit, dass die tatsächliche Länge der Importsequenz davon abweicht. Wenn die tatsächliche Importsequenz länger wäre, dann trüge das in der vorliegenden Arbeit exprimierte *AthSSB-1* N-terminal Aminosäuren, die die Bindungseigenschaften des Proteins inhibierend beeinflussen könnten.

Weiterhin konnte in Fluoreszenz-Titrationsen gezeigt werden, dass *AthSSB-1* nicht nur an poly(dT), sondern auch an poly(rU) bindet. Die Bindungsaffinität für poly(rU) ist aber deutlich geringer als die für poly(dT). Eine unterschiedliche Affinität zu ssDNA und ssRNA ist auch bei anderen SSBs beschrieben worden. So bindet *HsmtSSB* bei 0.2 M NaCl schwächer an poly(rU) als an poly(dT) (Curth *et al.*, 1994). Die relativ schwache Bindung von *AthSSB-1* an poly(rU) ist aber deshalb unerwartet, da bereits während der Proteinaufreinigung *AthSSB-1* an RNA gebunden hatte. Denkbar ist, dass die unterschiedliche Bindungsaffinität abhängig von der jeweiligen RNA-Spezies (mRNA, rRNA) ist. Oder es handelt sich um eine sequenzspezifische Bindung an RNA. Das hier verwendete poly(rU) stellt offensichtlich keine geeignete Modellsubstanz für die RNA-Bindung von *AthSSB-1* dar.

Die Bedeckungslänge eines *AthSSB-1* Monomers wurde bei der Bindung an poly(dT) in 75 mM NaCl zu $n=7-8$ und bei 150 mM zu $n=11$ bestimmt. Dies liegt in der Größenordnung der Bedeckungslänge des mitochondriellen Einzelstrang-DNA bindenden Protein aus *Rattus norvegicus* (*RnmtSSB*), die zu 8-9 Nukleotide pro Monomer bestimmt wurde (Hoke *et al.*, 1990). Thommes *et al.* (1995) beschreiben für *DmmtSSB* hingegen eine Bedeckungslänge von 17 Nukleotiden pro Monomer, die damit deutlich über der Bedeckungslänge von *AthSSB-1* liegt. Die ermittelten Werte von Restfluoreszenz, Bindungsaffinität und Bedeckungslänge von *AthSSB-1* zeigen ein salzabhängiges Bindungsverhalten des Proteins.

Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von *AthSSB-1* bei Konzentrationen <75 mM NaCl sowie der schwachen Bindung an poly(dT) bei 0.3 M NaCl, konnte eine umfassendere Untersuchung zur Salzabhängigkeit der Bedeckungslänge nicht durchgeführt werden.

Einzelstrang-DNA bindende Proteine, sollten in der Lage sein, doppelsträngige DNA zu destabilisieren. Dies konnte z.B. für *HsmtSSB* und *EcoSSB* in Schmelzexperimenten mit poly(dA-dT) gezeigt werden (Curth *et al.*, 1994). Da *AthSSB-1* bereits bei 30°C denaturiert, konnte eine solche Untersuchung jedoch nicht durchgeführt werden.

Insgesamt kann *AthSSB-1* aufgrund der Ergebnisse der Familie der Einzelstrang-DNA bindenden Proteine zugeordnet werden, wie es aufgrund der Sequenzhomologie zu den mitochondriellen SSBs zu erwarten war.

Die kinetischen Untersuchungen von *AthSSB-1* und poly(dT) zeigten einen biphasischen Verlauf der Reaktion, der sich aus einer schnellen Reaktion und einer nachfolgenden langsameren Reaktion zusammensetzt (Abbildung 26). Die Auswertung ließ sich unter der Annahme durchführen, dass nur die dimere Form des Proteins an poly(dT) binden kann, so dass sich die zwei Phasen der Reaktionskinetik wie folgt beschreiben lassen: In der ersten Phase der Reaktion binden alle verfügbaren Dimere an poly(dT). Sind alle anfänglich in der Lösung vorhandenen Dimere gebunden, so verlangsamt sich die Reaktion in der zweiten Phase, da die Assoziation zweier Monomere zum Dimer geschwindigkeitsbestimmend wird. Alternativ ist in der zweiten Phase auch denkbar, dass das *AthSSB-1* Monomer an poly(dT) bindet, und erst nach dessen Bindung die langsame Dimerisierung erfolgt. Anhand der Kinetikdaten lassen sich diese Möglichkeiten jedoch nicht unterscheiden. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für die *EcoSSB* Mutante H55K gezeigt, bei der durch die eingefügte Mutation die Fähigkeit des Proteins zur Tetramerisierung eingeschränkt ist (Curth *et al.*, 1991). In Lösung liegt das Protein vorwiegend dissoziiert vor, mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten die Autoren jedoch zeigen, dass H55K in seiner tetrameren Form an poly(dT) gebunden ist. In der Kinetik folgt auf die schnelle Assoziation der freien Tetramere mit der DNA, eine zweite langsamere Reaktion der dissoziierten Proteine.

Die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation in Kombination mit der kinetischen Untersuchung zeigen, dass das rekombinant hergestellte *AthSSB-1* in Lösung offensichtlich als partiell dissoziiertes Dimer vorliegt.

4.4 Lokalisation in der Pflanzenzelle

Zur Bestimmung der Lokalisation der Proteine in der Pflanzenzelle wurde der gegen *AthSSB-1* gerichtete polyklonale Antikörper eingesetzt. Mit diesem Antiserum konnte im Western-Blot von Ganzzell-Proteinextrakten aus *Arabidopsis* Blättern eine einzelne Bande bei ca. 32 kDa angefärbt werden. Das detektierte Protein scheint im Vergleich zum erwarteten Molekulargewicht des reifen *AthSSB-1*-Proteins (19 kDa) zu groß zu sein. In den als Kontrolle mit Präimmenserum durchgeführten Westernblots wurden keine Banden angefärbt. Auch bei der Verwendung des *AthSSB-1*-Antiserums nach Immunpräzipitation mit rekombinantem *AthSSB-1* ließ sich keine Bande nachweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass der Nachweis der 32 kDa Bande auf die mit *AthSSB-1* ausgefällten Immunglobuline zurückzuführen ist. Für das von der erwarteten Molmasse abweichende Ergebnis sind posttranslationale Modifikationen denkbar, durch die das Protein *in vivo* gegenüber dem rekombinanten Protein veränderte Eigenschaften aufweisen würde. Auf der anderen Seite erscheint eine Kreuzreaktion mit einem anderen (z.B. chloroplastidären) Protein nicht unwahrscheinlich. Wird eine solche Kreuzreaktivität angenommen, so müsste die 22 kDa Bande auch im Ganzzell-Lysat zu erwarten sein. Man kann jedoch vermuten, dass die Menge an *AthSSB-1* im Ganzzell-Lysat im Verhältnis zum Gesamtprotein niedrig und dadurch nicht mehr detektierbar war.

Um zu untersuchen, ob *AthSSB-1* im Mitochondrium vorliegt, wurde in einem anderen Ansatz das mitochondrielle Proteom aus *Arabidopsis*-Zellkulturen nach Auftrennung über 2D-Gel Elektrophorese ebenfalls im Westernblot eingesetzt. Hier ließen sich mit dem *AthSSB-1*-Antiserum zwei definierte Spots erkennen, die Proteinen mit einer Masse von ca. 22 kDa entsprechen und die sich in ihrem isoelektrischen Punkt (pI) unterscheiden. Es ist denkbar, dass es sich hierbei um Isoformen desselben Proteins handelt. Die verschiedenen pI-Werte könnten auf eine unterschiedliche Anzahl von Phosphorylierungen hindeuten. Mit immunhistochemischen Untersuchungen wurde zusätzlich versucht, die Proteine direkt *in vivo* nachzuweisen. In Pflanzenschnitten aus *Arabidopsis* zeigte sich ein schwacher Nachweis in Plastiden, hingegen nicht in Mitochondrien.

Um eine verlässliche Aussage über die Lokalisation treffen zu können, ist es notwendig, die Verunreinigungen der Präparation (hier der Mitochondrien-Präparation) so gering wie möglich zu halten. Im Zusammenhang mit dem Start des *Arabidopsis mitochondrial proteome project* wurde daher von Krufft *et al.* (2001) die von Werhahn *et al.* (2001) entwickelte Aufarbeitung von Mitochondrien aus *Arabidopsis*-Zellkulturen optimiert. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte mitochondrielle Proteom beruht auf einer solchen

Aufarbeitung aus *Arabidopsis*-Zellkulturen. Die Zellen wachsen dabei im Dunkeln heran, wodurch die Ausbildung von Chloroplasten unterdrückt wird. Das aus den Zellkulturen gewonnene Mitochondrien-Proteom besitzt auf diese Weise geringere Verunreinigungen durch plastidäre Proteine, als ein vergleichbarer Ansatz aus grünem Pflanzengewebe. Es lässt sich daher der Schluss ziehen, dass es sich bei dem angefärbten 22 kDa Protein um ein mitochondrielles SSB-Protein (*AthSSB-1*) handelt. Die Möglichkeit, dass es sich im Westernblot aufgrund von Verunreinigungen um einen Nachweis plastidärer SSB-Proteine handeln könnte, ist dagegen äußerst unwahrscheinlich.

Die Methode des immunhistochemischen Nachweises birgt zwar den Vorteil, die entsprechenden Proteine direkt den jeweiligen Organellen zuweisen zu können, die Fixierung des Blattmaterials kann jedoch dazu führen, dass die Antigenizität der Proteine verringert wird. Demnach besteht die Möglichkeit, dass geringe Mengen des *AthSSB-1* Proteins in den Mitochondrien nicht erkannt werden. Ob der immunologische Nachweis in den Plastiden eine spezifische Reaktion des Antiserums mit *AthSSB-1* oder eine Kreuzreaktion mit einem anderen Protein darstellt, lässt sich durch die vorliegenden Ergebnisse nicht ermitteln.

Letztlich kann für eine mögliche Erklärung der Ergebnisse auch der parallele Transport in beide Organelltypen nicht ausgeschlossen werden. So wurde beispielsweise für die chloroplastidäre Ferrochelatase-I gezeigt, dass das Vorläuferprotein *in vitro* sowohl in Chloroplasten, als auch in Mitochondrien transportiert wird, wobei die Importsequenz in beiden Fällen abgespalten wird (Chow *et al.*, 1997). Es ist daher denkbar, dass *AthSSB-1* sowohl im Chloroplasten als auch im Mitochondrium lokalisiert ist.

Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen zwar keine eindeutige Aussage zur Lokalisation treffen, dennoch kann die Annahme, dass *AthSSB-1* ein mitochondrielles SSB-Protein darstellt, mit den Ergebnissen folgendermaßen erklärt werden: Bei dem 22 kDa Protein handelt es sich um *AthSSB-1*, die 32 kDa Bande beruht dagegen auf einer Kreuzreaktivität mit einem stark exprimierten Protein aus Chloroplasten. Der fehlende Nachweis von *AthSSB-1* im Ganzzell-Lysat sowie in den Mitochondrien bei der immunhistochemischen Untersuchung, ist auf die geringe Menge bzw. auf die unzureichende Antigenizität des SSB-Proteins zurückzuführen. Wenn das im Westernblot des Ganzzell-Lysates nachgewiesene 32 kDa Protein im Chloroplasten lokalisiert ist, ließe sich der Nachweis bei der immunhistochemischen Untersuchung ebenfalls durch Kreuzreaktivität erklären.

Um diese Annahmen zu bestätigen, bedarf es weiterführender Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation. Insbesondere die Untersuchung des Chloroplasten-Proteoms im Westernblot könnte wichtige Erkenntnisse liefern.

5 Anhang

5.1 Sequenz von *AthSSB-1*

ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACGCGTTAGAATACTCAA
GCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCAGG

1 Met Asn Ser Leu Ala Ile Arg Val Ser Lys Val Leu Arg Ser Ser Ser Ile Ser
2 ATG AAC TCA CTC GCC ATT AGA GTC TCC AAG GTT CTC AGA TCC TCT TCA ATA TCT

19 Pro Leu Ala Ile Ser Ala Glu Arg Gly Ser Lys Ser Trp Phe Ser Thr Gly Pro
56 CCT TTA GCA ATA AGT GCT GAG AGA GGC TCT AAG TCG TGG TTC TCT ACT GGT CCT

37 Ile Asp Glu Gly Val Glu Glu Asp Phe Glu Glu Asn Val Thr Glu Arg Pro Glu
110 ATC GAT GAA GGT GTA GAA GAA GAT TTT GAA GAA AAT GTT ACA GAA AGG CCT GAG

55 Leu Gln Pro His Gly Val Asp Pro Arg Lys Gly Trp Gly Phe Arg Gly Val His
164 CTT CAA CCT CAT GGA GTT GAT CCT CGT AAA GGT TGG GGA TTT CGC GGT GTT CAT

73 Arg Ala Ile Ile Cys Gly Lys Val Gly Gln Ala Pro Leu Gln Lys Ile Leu Arg
218 AGG GCG ATT ATT TGT GGG AAA GTA GGG CAA GCA CCG TTA CAG AAG ATC TTA AGG

91 Asn Gly Arg Thr Val Thr Ile Phe Thr Val Gly Thr Gly Gly Met Phe Asp Gln
272 AAC GGG CGG ACA GTA ACG ATC TTT ACA GTA GGA ACA GGT GGG ATG TTT GAT CAG

109 Arg Leu Val Gly Ala Thr Asn Gln Pro Lys Pro Ala Gln Trp His Arg Ile Ala
326 AGG CTT GTA GGA GCT ACT AAT CAG CCA AAA CCA GCT CAG TGG CAT AGA ATC GCT

127 Val His Asn Glu Val Leu Gly Ser Tyr Ala Val Gln Lys Leu Ala Lys Asn Ser
380 GTG CAC AAC GAA GTG CTT GGC TCT TAC GCT GTC CAA AAA CTC GCT AAA AAC TCG

145 Ser Val Tyr Val Glu Gly Asp Ile Glu Thr Arg Val Tyr Asn Asp Ser Ile Ser
434 TCG GTT TAT GTG GAA GGT GAT ATT GAG ACT AGA GTG TAT AAT GAT AGC ATC AGC

163 Ser Glu Val Lys Ser Ile Pro Glu Ile Cys Val Arg Arg Asp Gly Lys Ile Arg
488 AGT GAA GTG AAG AGT ATC CCT GAG ATT TGC GTT CGT CGT GAT GGT AAG ATT CGG

181 Met Ile Lys Tyr Gly Glu Ser Ile Ser Lys Ile Ser Phe Asp Glu Leu Lys Glu
542 ATG ATC AAA TAT GGT GAA AGC ATT AGC AAA ATC TCT TTT GAT GAG CTA AAA GAA

199 Gly Leu Ile *** Ser Glu Gln Glu Tyr Ser Gly Asp Arg Met Arg Ala Asn ***
596 GGA TTG ATT TAG TCG GAG CAA GAA TAT TCC GGT GAC CGG ATG AGA GCA AAC TGA

217 Ile
650 ATA

ACCTGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTG
AGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGA

Die Sequenz ist im Vektor PCR-Zero Blunt dargestellt. Die korrigierte DNA-Sequenz von *AthSSB-1* wurde unter der Accession-Nummer AJ582222 in der EMBL Datenbank hinterlegt. Die Sequenzen der zur Sequenzierung verwendeten Primer sind unterstrichen.

5.2 Sequenz von *AthSSB-2*

1 Met Ala Asn Ser Met Ala Thr Leu Ser Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Leu Leu Ser
 2 ATG GCG AAT TCA ATG GCT ACA CTT TCT AGA AGA CTC TAT CGA TCT CTT CTA TCG

 19 Asn Pro Arg Ile Ser Gln Ala Ser Met Ser Phe Cys Thr Asn Asn Ile Thr Ser
 56 AAC CCT AGA ATT TCT CAA GCT TCC ATG TCT TTC TGT ACC AAC AAC ATC ACT TCC

 37 Pro Glu Asp Ser Asp Phe Asp Glu Leu Glu Ser Pro Ile Glu Pro Lys Ala Ser
 110 CCA GAA GAC TCC GAC TTT GAC GAG TTA GAA TCG CCC ATT GAA CCA AAG GCC TCA

 55 Asp Pro Val Ser Arg Phe Ser Gly Glu Glu Arg Val Met Glu Glu Arg Pro Leu
 164 GAT CCA GTT TCT CGA TTT TCC GGA GAA GAA CGC GTT ATG GAA GAG CGT CCA CTC

 73 Glu Asn Gly Leu Asp Ser Gly Ile Phe Lys Ala Ile Leu Val Gly Gln Val Gly
 218 GAA AAT GGC CTT GAC TCT GGC ATT TTC AAG GCA ATA TTG GTG GGG CAA GTG GGT

 91 Gln Leu Pro Leu Gln Lys Lys Leu Lys Ser Gly Arg Thr Val Thr Leu Phe Ser
 272 CAG CTT CCT CTG CAG AAG AAG CTT AAG AGT GGT AGA ACT GTC ACT CTC TTC TCT

 109 Val Gly Thr Gly Gly Ile Arg Asn Asn Arg Arg Pro Leu Ile Asn Glu Asp Pro
 326 GTA GGA ACT GGT GGG ATC AGG AAC AAC CGG AGA CCG CTT ATT AAC GAA GAT CCG

 127 Arg Glu Tyr Ala Ser Arg Ser Ala Val Gln Trp His Arg Val Ser Val Tyr Pro
 380 AGA GAG TAT GCG AGC CGG TCT GCG GTG CAG TGG CAC CGT GTC TCT GTT TAC CCT

 145 Glu Arg Leu Ala Asp Leu Val Leu Lys Asn Val Glu Pro Gly Thr Val Ile Tyr
 434 GAA CGC TTG GCA GAT CTT GTG TTG AAG AAT GTT GAA CCC GGT ACT GTT ATC TAC

 163 Leu Glu Gly Asn Leu Glu Thr Lys Ile Phe Thr Asp Pro Val Thr Gly Leu Val
 488 TTA GAG GGT AAT CTG GAG ACG AAG ATA TTC ACT GAT CCT GTC ACT GGT TTG GTT

 181 Arg Arg Ile Arg Glu Val Ala Ile Arg Arg Asn Gly Arg Val Val Phe Leu Gly
 542 CGA CGT ATA AGA GAA GTA GCA ATT CGT AGA AAC GGC CGA GTT GTG TTT TTG GGA

 199 Lys Ala Gly Asp Met Gln Gln Pro Ser Ser Ala Glu Leu Arg Gly Val Gly Tyr
 596 AAA GCC GGT GAT ATG CAG CAA CCG AGT TCT GCT GAG CTT AGA GGC GTT GGC TAC

 217 Tyr *** Phe Leu Thr Tyr Lys Lys Leu Leu Ser *** Arg Tyr Thr Ile Cys Tyr
 650 TAC TGA TTT TTA ACA TAC AAA AAA TTG TTG TCA TAA AGG TAC ACA ATT TGC TAT

 235 Cys Ser Ile Ser Ser Phe Ala Ser Val Val Ser Ser Cys Asn Leu Lys Val Trp
 704 TGT AGT ATT TCT AGT TTC GCT TCT GTT GTC TCT TCT TGT AAC TTG AAG GTT TGG

 253 Phe Ser Val Leu Gln Leu Ala Leu Ala Leu Phe His Gly Phe Arg Gln Ile Asn
 758 TTT AGT GTT CTT CAA TTG GCA TTG GCC CTT TTC CAT GGT TTT CGG CAA ATA AAC

 271 Pro
 812 CCA

Die Sequenzen der zur Sequenzierung verwendeten Primer sind unterstrichen.

5.3 Oligonukleotide

5.3.1 PCR-Primer zur Amplifikation von *AthSSB-1*

SSB H	5'	CGG AAG CCC ATG GCC TCA CTC GCC ATT AGA GTC TCC AAG GTT CT
SSB R	5'	CGG AAG CTC GAG CTA AAT CAA TCC TTC TTC TGC CAA ATG TGA
SSB1	5'	CGC GGT GTT CAT AGG GCG ATT A
SSB2	5'	CTC AAT ATC ACC TTC CAC ATA A
SSB3	5'	ATG AAC TCA CTC GCC ATT AGA G
SSB4	5'	TTA TTC AGT TTG CTC TCA TCC G
SSB5EcoRI	5'	GGA AGG AAT TCT AGC GAT GAA CTC ACT CGC CAT TAG
SSB6EcoRI	5'	GGA AGG AAT TCT TAT TCA GTT TGC TCT CAT CCG
SSB9NcoI	5'	CGG AAG CCC ATG GCC TCA CTC GCC ATT AGA GTC TC
SSB10XhoI	5'	GGA AGC TCG AGT TAT TCA GTT TGC TCT CAT CCG
AthBamHI	5'	GGA AGG GAT CCT CAT AGT CGT GGT TCT CTA CTG

5.3.2 PCR-Primer zur Amplifikation von *AthSSB-2*

SSB2R-XhoI	5'	GGA AGC TCG AGT CAG TAG TAG CCA ACG CCT CTA
SSB2H-NcoI	5'	CGG AAG CCC ATG GCG AAT TCA ATG GCT ACA C
Ath2BamHI	5'	GGA AGG GAT CCT CTC AGG CTT CCA TGT CTT TCT
Ath2R5XhoI	5'	GGA AGC TCG AGA ACA GAA GCG AAA CTA GAA AT
Ath2H2	5'	CCA CTC GAA AAT GGC CTT GAC T
Ath2R3	5'	GCA CCG CAG ACC GGC TCG CAT A

Die in den Primern enthaltenen Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen, durch die eine spätere Klonierung ermöglicht wird, sind jeweils durch Fettdruck hervorgehoben.

6 Literatur

- Alberts, B.M. und Frey, L. (1970). "T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA." Nature **227**(265): 1313-1318.
- Barat, M. und Mignotte, B. (1981). "A DNA binding protein from *Xenopus laevis* oocyte mitochondria." Chromosoma **82**(4): 583-593.
- Bayer, I., Fliess, A., Greipel, J., Urbanke, C. und Maass, G. (1989). "Modulation of the affinity of the single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli* (*E. coli* SSB) to poly(dT) by site-directed mutagenesis." Eur J Biochem **179**(2): 399-404.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E.M. und Couturier, M. (1994). "Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene." Gene **148**(1): 71-74.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1521.
- Bochkareva, E., Korolev, S., Lees-Miller, S.P. und Bochkarev, A. (2002). "Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA." Embo J **21**(7): 1855-1863.
- Bredderman, P.J. (1974). "Tryptophan analysis of proteins in 6M guanidine hydrochloride: modification for more general application." Anal Biochem **61**(1): 298-301.
- Chow, K.S., Singh, D.P., Roper, J.M. und Smith, A.G. (1997). "A single precursor protein for ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported in vitro into both chloroplasts and mitochondria." J Biol Chem **272**(44): 27565-27571.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989). "One-step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **86**: 2172-2175.
- Claros, M.G. und Vincens, P. (1996). "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences." Eur J Biochem **241**(3): 779-786.
- Clayton, D.A. (2000). "Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises." Exp Cell Res **255**(1): 4-9.
- Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L.H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P. und LeCocq, J.P. (1984). "High level production of biologically active human α_1 -antitrypsin in *Escherichia coli*." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **81**: 669-673.

- Curth, U. (1993).** Einzelstrang-DNA bindende Proteine aus *Escherichia coli* und menschlichen Mitochondrien: Bedeutung einzelner Tryptophanreste für die Protein-DNA-Wechselwirkung. Dissertation, Universität Hannover.
- Curth, U., Bayer, I., Greipel, J., Mayer, F., Urbanke, C. und Maass, G. (1991).** "Amino acid 55 plays a central role in tetramerization and function of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein." Eur J Biochem **196**(1): 87-93.
- Curth, U., Urbanke, C., Greipel, J., Gerberding, H., Tiranti, V. und Zeviani, M. (1994).** "Single-stranded-DNA-binding proteins from human mitochondria and *Escherichia coli* have analogous physicochemical properties." Eur J Biochem **221**(1): 435-443.
- Dabrowski, S., Olszewski, M., Piatek, R., Brillowska-Dabrowska, A., Konopa, G. und Kur, J. (2002).** "Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus* - new arrangement of binding domains." Microbiology **148**(Pt 10): 3307-3315.
- Davies, G.E. und Stark, G.R. (1970).** "Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(3): 651-656.
- de Vries, J., Genschel, J., Urbanke, C., Thole, H. und Wackernagel, W. (1994).** "The single-stranded-DNA-binding proteins (SSB) of *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens*." Eur J Biochem **224**(2): 613-622.
- Elledge, S.J., Mulligan, J.T., Ramer, S.W., Spottswood, M. und Davis, R.W. (1991).** "Lambda YES: a multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1731-1735.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G. (2000).** "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." J Mol Biol **300**(4): 1005-1016.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und von Heijne, G. (1999).** "ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites." Protein Sci **8**(5): 978-984.
- Farr, C.L., Wang, Y. und Kaguni, L.S. (1999).** "Functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein. Template-primer DNA binding and initiation and elongation of DNA strand synthesis." J Biol Chem **274**(21): 14779-14785.

- Garcia-Maya, M.M. und Buck, K.W. (1997).** "Novel single-stranded DNA binding proteins from tobacco." Plant Physiology and Biochemistry **35**(9): 719-728.
- Garcia-Maya, M.M. und Buck, K.W. (1997).** "Isolation and characterization of replication protein A (RP-A) from tobacco cells." FEBS Lett **413**(1): 181-184.
- Gavel, Y. und von Heijne, G. (1990).** "Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides." Protein Eng **4**(1): 33-37.
- Genschel, J. (1995).** Untersuchungen zur Funktion bakterieller Einzelstrang-DNA bindender Proteine. Dissertation, Universität Hannover: 131.
- Genschel, J., Litz, L., Thole, H., Roemling, U. und Urbanke, C. (1996).** "Isolation, sequencing and overproduction of the single-stranded DNA binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* PAO." Gene **182**(1-2): 137-143.
- Ghir, R., Lecaer, J.P., Dufresne, C. und Gueride, M. (1991).** "Primary structure of the two variants of *Xenopus laevis* mtSSB, a mitochondrial DNA binding protein." Arch Biochem Biophys **291**(2): 395-400.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A. und Briggs, S. (2002).** "A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica)." Science **296**(5565): 92-100.
- Goldberg, A.L. (1992).** "The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells." Eur J Biochem **203**(1-2): 9-23.
- Gottesman, S., Halpern, E. und Trisler, P. (1981).** "Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **148**(1): 265-273.
- Greipel, J., Maass, G. und Mayer, F. (1987).** "Complexes of the single-stranded DNA-binding protein from *Escherichia coli* (Eco SSB) with poly(dT). An investigation of their structure and internal dynamics by means of electron microscopy and NMR." Biophys Chem **26**(2-3): 149-161.

- Hoke, G.D., Pavco, P.A., Ledwith, B.J. und Van Tuyle, G.C. (1990).** "Structural and functional studies of the rat mitochondrial single strand DNA binding protein P16." Arch Biochem Biophys **282**(1): 116-124.
- Hollis, T., Stattel, J.M., Walther, D.S., Richardson, C.C. und Ellenberger, T. (2001).** "Structure of the gene 2.5 protein, a single-stranded DNA binding protein encoded by bacteriophage T7." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9557-9562.
- Hotta, Y. und Stern, H. (1971).** "A DNA-binding protein in meiotic cells of *Lilium*." Dev Biol **26**(1): 87-99.
- Iftode, C., Daniely, Y. und Borowiec, J.A. (1999).** "Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB." Crit Rev Biochem Mol Biol **34**(3): 141-180.
- Jarosik, G.P. und Hansen, E.J. (1994).** "Cloning and sequencing of the *Haemophilus influenzae* ssb gene encoding single-strand DNA-binding protein." Gene **146**(1): 101-103.
- Kindler, B. (1997).** AKKUPROG: Auswertung von Messungen chemischer Reaktionsgeschwindigkeit und Analyse von Biopolymeren in der Ultrazentrifuge. Anwendung auf Protein-DNA Wechselwirkungen. Dissertation, Universität Hannover.
- Kneale, G.G. (1992).** "Single stranded DNA-binding proteins." Current Opinion in Structural Biology **2**(1): 124-130.
- Kruft, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W. und Braun, H.P. (2001).** "Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*." Plant Physiol **127**(4): 1694-1710.
- Laemmli, U.K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-685.
- Lamm, O. (1929).** "Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung." Arkiv för matematik, astronomi och fysik **21B No. 2**.
- Landwehr, M., Curth, U. und Urbanke, C. (2002).** "A dimeric mutant of the homotetrameric single-stranded DNA binding protein from *Escherichia coli*." Biol Chem **383**(9): 1325-1333.
- Lebowitz, J., Lewis, M.S. und Schuck, P. (2002).** "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review." Protein Sci **11**(9): 2067-2079.
- Li, K. und Williams, R.S. (1997).** "Tetramerization and single-stranded DNA binding properties of native and mutated forms of murine mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins." J Biol Chem **272**(13): 8686-8694.

- Loguercio Polosa, P., Megli, F., Di Ponzio, B., Gadaleta, M.N., Cantatore, P. und Roberti, M. (2002).** "Cloning of two sea urchin DNA-binding proteins involved in mitochondrial DNA replication and transcription." Gene **286**(1): 113-120.
- Lohman, T.M. und Bujalowski, W. (1990).** *E. coli* single strand binding protein: multiple single stranded DNA binding modes and cooperativities. The Biology of non specific protein DNA interactions. A. Revzin. Boca Raton, Fl., CRC Press: 131-168.
- Lohman, T.M., Bujalowski, W. und Overman, L.B. (1988).** "*E.coli* single strand binding protein: a new look at helix destabilizing proteins." Trends.in.Biochemical.Sciences **13**: 250-255.
- Lohman, T.M. und Ferrari, M.E. (1994).** "*Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities." Annu Rev Biochem **63**: 527-570.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951).** "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Marton, R.F., Thommes, P. und Cotterill, S. (1994).** "Purification and characterisation of dRP-A: a single-stranded DNA binding protein from *Drosophila melanogaster*." FEBS Lett **342**(2): 139-144.
- Meyer, R.R. und Laine, P.S. (1990).** "The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*." Microbiol Rev **54**(4): 342-380.
- Mignotte, B., Barat, M. und Mounolou, J.C. (1985).** "Characterization of a mitochondrial protein binding to single-stranded DNA." Nucleic Acids Res **13**(5): 1703-1716.
- Mikhailov, V.S. und Bogenhagen, D.F. (1996).** "Effects of *Xenopus laevis* mitochondrial single-stranded DNA-binding protein on primer-template binding and 3'-->5' exonuclease activity of DNA polymerase gamma." J Biol Chem **271**(31): 18939-18946.
- Murzin, A.G. (1993).** "OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences." Embo J **12**(3): 861-867.
- Nakai, K. und Kanehisa, M. (1992).** "A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells." Genomics **14**(4): 897-911.
- Nosek, J., Dinouel, N., Kovac, L. und Fukuhara, H. (1995).** "Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions." Mol Gen Genet **247**(1): 61-72.
- Nosek, J., Tomaska, L., Fukuhara, H., Suyama, Y. und Kovac, L. (1998).** "Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line." Trends Genet **14**(5): 184-188.

- Nosek, J., Tomaska, L., Pagacova, B. und Fukuhara, H. (1999).** "Mitochondrial telomere-binding protein from *Candida parapsilosis* suggests an evolutionary adaptation of a nonspecific single-stranded DNA-binding protein." J Biol Chem **274**(13): 8850-8857.
- Pavco, P.A. und Van Tuyle, G.C. (1985).** "Purification and general properties of the DNA-binding protein (P16) from rat liver mitochondria." J Cell Biol **100**(1): 258-264.
- Porter, R., Black, S., Pannuri, S. und Carlson, A. (1990).** "Use of the *Escherichia coli* ssb Gene to prevent Bioreactor Takeover by plasmidless Cells." BioTechnology **8**: 47-51.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A. und Baumeister, K. (1987).** "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides." Science **238**(4825): 336-341.
- Purnapatre, K. und Varshney, U. (1999).** "Cloning, over-expression and biochemical characterization of the single-stranded DNA binding protein from *Mycobacterium tuberculosis*." Eur J Biochem **264**(2): 591-598.
- Raghunathan, S., Kozlov, A.G., Lohman, T.M. und Waksman, G. (2000).** "Structure of the DNA binding domain of *E. coli* SSB bound to ssDNA." Nat Struct Biol **7**(8): 648-652.
- Raghunathan, S., Ricard, C.S., Lohman, T.M. und Waksman, G. (1997).** "Crystal structure of the homo-tetrameric DNA binding domain of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein determined by multiwavelength x-ray diffraction on the selenomethionyl protein at 2.9-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6652-6657.
- Roberti, M., Musicco, C., Loguercio Polosa, P., Gadaleta, M.N., Quagliariello, E. und Cantatore, P. (1997).** "Purification and characterization of a mitochondrial, single-stranded-DNA-binding protein from *Paracentrotus lividus* eggs." Eur J Biochem **247**(1): 52-58.
- Sanger, F. und Coulson, A.R. (1975).** "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." J.Mol.Biol. **94**: 441-448.
- Schagger, H. und von Jagow, G. (1987).** "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.
- Schuck, P. (2000).** "Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling." Biophys J **78**(3): 1606-1619.

- Schuler, G.D., Altschul, S.F. und Lipman, D.J. (1991). "A workbench for multiple alignment construction and analysis." Proteins **9**(3): 180-190.
- Schwarz, G. und Watanabe, F. (1983). "Thermodynamics and kinetics of co-operative protein-nucleic acid binding. I. General aspects of analysis of data." J Mol Biol **163**(3): 467-484.
- Shadel, G.S. und Clayton, D.A. (1997). "Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates." Annu Rev Biochem **66**: 409-435.
- Sigal, N., Delius, H., Kornberg, T., Gefter, M.L. und Alberts, B. (1972). "A DNA-unwinding protein isolated from *Escherichia coli*: its interaction with DNA and with DNA polymerases." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(12): 3537-3541.
- Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." Gene **67**(1): 31-40.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **408**(6814): 796-815.
- Thommes, P., Farr, C.L., Marton, R.F., Kaguni, L.S. und Cotterill, S. (1995). "Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein from *Drosophila* embryos. Physical and biochemical characterization." J Biol Chem **270**(36): 21137-21143.
- Tiranti, V., Rocchi, M., DiDonato, S. und Zeviani, M. (1993). "Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB)." Gene **126**(2): 219-225.
- Tomaska, L., Nosek, J. und Fukuhara, H. (1997). "Identification of a putative mitochondrial telomere-binding protein of the yeast *Candida parapsilosis*." J Biol Chem **272**(5): 3049-3056.
- Tomaska, L., Nosek, J. und Kucejova, B. (2001). "Mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins: in search for new functions." Biol Chem **382**(2): 179-186.
- Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. und Brennicke, A. (1997). "The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides." Nat Genet **15**(1): 57-61.
- Uversky, V.N. (2002). "What does it mean to be natively unfolded?" Eur J Biochem **269**(1): 2-12.

- Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B. und Brill, S.J. (1992).** "A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB." Embo J **11**(9): 3421-3430.
- Van Tuyle, G.C. und Pavco, P.A. (1985).** "The rat liver mitochondrial DNA-protein complex: displaced single strands of replicative intermediates are protein coated." J Cell Biol **100**(1): 251-257.
- Wadsworth, R.I. und White, M.F. (2001).** "Identification and properties of the crenarchaeal single-stranded DNA binding protein from *Sulfolobus solfataricus*." Nucleic Acids Res **29**(4): 914-920.
- Ward, B.L., Anderson, R.S. und Bendich, A.J. (1981).** "The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (cucurbitaceae)." Cell **25**(3): 793-803.
- Webster, G., Genschel, J., Curth, U., Urbanke, C., Kang, C. und Hilgenfeld, R. (1997).** "A common core for binding single-stranded DNA: structural comparison of the single-stranded DNA-binding proteins (SSB) from *E. coli* and human mitochondria." FEBS Lett **411**(2-3): 313-316.
- Werhahn, W. und Braun, H.P. (2002).** "Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis." Electrophoresis **23**(4): 640-646.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Krufft, V.V., Schmitz, U.K. und Braun, H.P. (2001).** "Purification and Characterization of the Preprotein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane from *Arabidopsis*. Identification of Multiple Forms of TOM20." Plant Physiol **125**(2): 943-954.
- Whelan, J. und Glaser, E. (1997).** "Protein import into plant mitochondria." Plant Mol Biol **33**(5): 771-789.
- Williams, K.R., Murphy, J.B. und Chase, J.W. (1984).** "Characterization of the structural and functional defect in the *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein encoded by the *ssb-1* mutant gene. Expression of the *ssb-1* gene under lambda pL regulation." J Biol Chem **259**(19): 11804-11811.
- Williams, K.R., Spicer, E.K., LoPresti, M.B., Guggenheimer, R.A. und Chase, J.W. (1983).** "Limited proteolysis studies on the *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein. Evidence for a functionally homologous domain in both the *Escherichia coli* and T4 DNA binding proteins." J Biol Chem **258**(5): 3346-3355.

-
- Yang, C., Curth, U., Urbanke, C. und Kang, C. (1997).** "Crystal structure of human mitochondrial single-stranded DNA binding protein at 2.4 Å resolution." Nat Struct Biol **4**(2): 153-157.
- Yuzhakov, A., Kelman, Z. und O'Donnell, M. (1999).** "Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase." Cell **96**(1): 153-163.
- Zabeau, M. und Stanley, K.K. (1982).** "Enhanced Expression of cro-beta-Galactosidase Fusion Proteins under the control of the P_R Promoter of Bacteriophage lambda." EMBO J. **1**(10): 1217-1224.
- Zhang, S.P., Zubay, G. und Goldman, E. (1991).** "Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates." Gene **105**(1): 61-72.

Lebenslauf

Kathrin Hagemann

- 02.02.1967 geboren in Hannover
- 08/1973-06/1986 Besuch der Integrierten Gesamtschule Hannover-Roderbruch
- 06/1986 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
- 08/1987-01/1990 Ausbildung zur Kauffrau im Groß- und Außenhandel, August Schroeder Stahlhandel GmbH & Co. KG, Hannover
- 02/1990-08/1993 Berufstätigkeit als kaufmännische Angestellte, Fa. August Schroeder Stahlhandel GmbH & Co. KG, Hannover
- 10/1993-07/1999 Studium der Biologie an der Universität Hannover
Studienschwerpunkt Zoologie, Ökologie, Biochemie, Parasitologie
- 09/1996-07/1997 Studienaufenthalt an der Northeastern University, Department of Biology, Boston, USA,
- 03/2000-06/2000 molekularbiologisches Praktikum am Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover
- 07/2000-06/2004 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Urbanke.